

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος καρπού από
Ευρωπαϊκή καστανιά (Castanea sativa mill) σε μυϊκά κύτταρα
C2C12*

*Study of antioxidant activity of chestnut fruit extract from
Castanea sativa mill in myoblasts C2C12 cell line*

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ-ΤΣΑΝΤΑΡΑΙΩΤΟΥ ΑΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Καθηγητής Μηχανικής Μεταποίησης Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κύριου Στάγκου Δημήτριου, Επικουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Στάγκο για την ευκαιρία που μου πρόσφερε αναθέτοντας μου αυτή τη διπλωματική εργασία μέσω της οποίας μπόρεσα να έρθω σε επαφή με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο. Επιπλέον, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις γνώσεις και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και για την προσηνή του στάση και τη διάθεση του να με βοηθήσει να ξεπεράσω κάθε τροχοπέδη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, καθώς και για την προσφορά και τη στήριξη του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Πετρωτό Κωνσταντίνο για την προθυμία του να αξιολογήσει την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κούρτη Μαρία, μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, για την συνδρομή της στην πραγματοποίηση ορισμένων πειραματικών μεθόδων.

Βαθύτατα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτρια μου Ηλιοπούλου Σταυρούλα για το άριστο κλίμα συνεργασίας και συμπαράστασης το οποίο έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που με στήριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες	7
1.1.1 Ελεύθερες ρίζες	7
1.2 Πηγές ελεύθερων ριζών	8
1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	11
1.4 Φυτικές πολυφαινόλες	16
1.5 Ευρωπαϊκή καστανιά (<i>Castanea sativa</i>)	20
1.6 Μυϊκά κύτταρα και οξειδωτικό στρες	25
2. Σκοπός	26
3.Υλικά και μέθοδοι	27
3.1Απομόνωση εκχυλισμάτων	27
3.2Καλλιέργεια κυττάρων	27
3.3Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των δύο εκχυλισμάτων μέσω XTT	28
3.4Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	29
3.5Προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford...	33
3.6. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μέσω του υπολογισμού της ρίζας DPPH.....	33
3.7Στατιστική ανάλυση	35
4.Αποτελέσματα.....	35
4.1 Επίδραση των εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 (XTT)	35
4.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS, σε μυϊκά κύτταρα C2C12.	38
4.3 Επίδραση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, GSH, σε μυϊκά κύτταρα C2C12	42
5.Συζήτηση.....	48
6.Βιβλιογραφία	53

Περίληψη

Η Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa mill*) αποτελεί ένα είδος ιδιαίτερα διαδεδομένο στις μεσογειακές χώρες. Ο καρπός της αλλά και άλλα μέρη του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και αποτελούν αντικείμενο μελέτης λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους.

Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος που απομονώθηκε από τον καρπό της καστανιάς του είδους *Castanea sativa mill* σε κυτταρική σειρά μυβλαστών ποντικού C2C12 καθώς και το ενθυλακωμένο προϊόν με μέσο ενθυλάκωσης την οροπρωτεΐνη γάλακτος σε διαφορετικές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Οι αντιοξειδωτικοί δείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα του κάστανου μείωσε τα επίπεδα των ROS στις συγκεντρώσεις 125μg/ml και 250μg/ml ενώ το ενθυλακωμένο εκχύλισμα στη συγκέντρωση 1000μg/ml. Αντίστοιχα, το εκχύλισμα κάστανου αύξησε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στις συγκεντρώσεις 62,5μg/ml 125μg/ml, 250μg/ml ενώ το ενθυλακωμένο προϊόν στα 1000μg/ml. Τέλος, όσον αφορά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυτή μειώθηκε παρουσία του εκχυλίσματος κάστανου στις συγκεντρώσεις 125μg/ml και 250μg/ml ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή παρουσία του ενθυλακωμένου προϊόντος. Μια πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος μειώνει τα επίπεδα των ROS ενώ παράλληλα δεν καταναλώνεται με τον ίδιο ρυθμό η GSH και για αυτό παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της. Μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι παρουσία του εκχυλίσματος ενισχύεται η σύνθεση της γλουταθειόνης ενώ παράλληλα εξουδετερώνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου και γιαυτό παρατηρείται μείωση των ROS. Η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κυττάρου πιθανότατα είναι αποτέλεσμα προσαρμοστικού μηχανισμού του κυττάρου.

Λέξεις-Κλειδιά: Οξειδωτικό στρες, πολυφαινόλες, εκχυλίσματα καρπού κάστανου, μυϊκά κύτταρα.

Abstract

European chestnut (*Castanea sativa*) is a species very common in Mediterranean countries. Its fruit and other parts of the plant are rich in polyphenols which are known for their beneficial properties.

Thus, in the present study, the antioxidant activity of non-cytotoxic concentrations of the polyphenolic extract isolated from the chestnut fruit of the species *Castanea sativa mill* in C2C12 mice cell line as well as the whey protein encapsulated product were examined. The antioxidant biomarkers identified were glutathione (GSH), reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (TAC).

From the results of the present study it was observed that the chestnut extract reduced the levels of ROS at 125µg/ml and 250µg/ml while the encapsulated extract at 1000µg/ml. Respectively, the chestnut extract increased the levels of glutathione (GSH) at 62.5µg/ml 125µg/ml, 250µg/ml while the encapsulated product at 1000µg/ml. Finally, the total antioxidant capacity was decreased in the presence of chestnut extract at 125µg/ml and 250µg/ml, while in the presence of the encapsulated product no statistically significant difference was observed. A possible explanation for these results is that the antioxidant activity of the extract reduces the levels of ROS while GSH is not consumed at the same rate and therefore there is an increase in its levels. Another explanation could be that in the presence of the extracts, the synthesis of glutathione is enhanced while at the same time the active forms of oxygen are neutralized and therefore a decrease in ROS is observed. The total antioxidant capacity reduction probably is a result of cellular acclimatization

Key words: Oxidative stress, polyphenols, chestnut nut extracts, muscle cells.

1.Εισαγωγή

1.1 Το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες

Το οξυγόνο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μόρια για την επιβίωση των αερόβιων οργανισμών καθώς σε συνδυασμό με ενώσεις που παρέχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια ώστε να επιτελούνται οι πολυάριθμες λειτουργίες των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων του (Fridovich, 1998). Κατά τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια παράγεται φυσιολογικά ένα μικρό ποσοστό δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης και παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού (Young I, Woodside J, 2001, Droge W, 2002).

Παράλληλα όμως, το οξυγόνο και οι δραστικές μορφές του ευθύνονται για οξειδωτικές βλάβες στα μακρομόρια, με κυριότερα τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα (Εικόνα 1), του κυττάρου με αποτέλεσμα να προκαλείται μια κατάσταση στρες στο κύτταρο που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες (Ντουνούση *et al.*, 2009). Το οξειδωτικό στρες (Εικόνα 1) είναι ένα φαινόμενο που προκαλείται από τη διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων των οξειδωτικών παραγόντων σε κύτταρα και ιστούς και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού (Pizzino *et al.*, 2017). Με αυτή την παθολογική κατάσταση έχουν συσχετιστεί πολλά προβλήματα συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, του καρκίνου, του διαβήτη, των μεταβολικών διαταραχών, της αθηροσκλήρωσης και των καρδιαγγειακών παθήσεων (Pizzino *et al.*, 2017). Οι κύριοι οξειδωτικοί παράγοντες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), κάποιες από τις οποίες είναι ελεύθερες ρίζες.

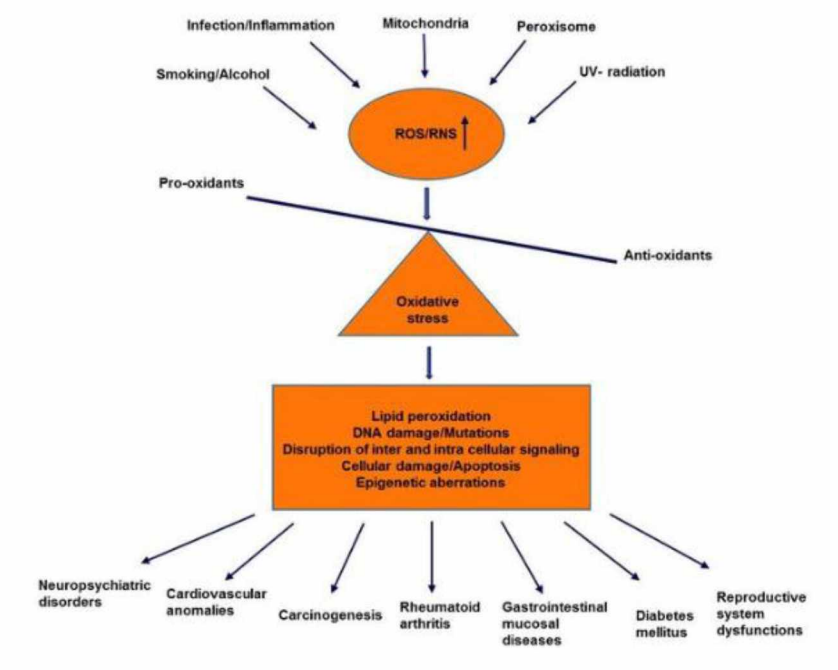
1.1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα τα οποία διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Halliwell and Gutteridge, 1985; Royston, 1988). Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά τις ελεύθερες ρίζες, εξαιρετικά ασταθείς αλλά και ιδιαίτερα δραστικές καθώς τείνουν να αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις για να ζευγαρώσουν τα μονήρη ηλεκτρόνια τους και να επέλθουν σε μια σταθερή κατάσταση (Uttara *et al.*, 2009). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}), η ρίζα του περοξυλίου (ROO^{\bullet}) το μονοξείδιο (NO) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2). Άλλες

δραστικές ενώσεις οι οποίες δεν συγκαταλέγονται στις ελεύθερες ρίζες αλλά μπορούν υπό προϋποθέσεις να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών είναι μεταξύ άλλων το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υποβρωμιώδες οξύ (HOBr), το όζον (O_3), το μοριακό οξυγόνο (O_2), το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το κατιόν νιτροζυλίου (NO^+), το νιτροξυλικό ανιόν (NO^-), το τριοξείδιο του αζώτου (N_2O_3), το τετραοξείδιο του δινιτρογόνου (N_2O_4), το κατιόν νιτρίλιου (NO_2^+) (Kohen and Nyska, 2002, Halliwell, 2003). Η ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet), η πιο δραστική ελεύθερη ρίζα in vivo, σχηματίζεται από H_2O_2 παρουσία Fe^{2+} ή Cu^+ (καταλύτης). Αυτή η αντίδραση είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Η αντίδραση Fenton



Εικόνα 1. Οι κυριότερες αιτίες και επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες.

1.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών οφείλεται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες. Σε κάθε περίπτωση διαφέρει ο τρόπος σχηματισμού τους (Cheesman and Slater, 1993).

Εξωγενής οδός

Στις εξωγενείς πηγές συγκαταλέγονται η ακτινοβολία ιονισμού, η υπεριώδης ακτινοβολία, η θερμότητα, η ρύπανση του αέρα και των υδάτων, ο καπνός, το οινόπνευμα, τα βαρέα μέταλλα, τα φάρμακα (λόγου χάρη κυκλοσπορίνη, τακρόλιμους, γενταμυκίνη και μπλεομυκίνη) και οι βιομηχανικοί διαλύτες (Εικόνα 2). Κατά την εξωγενή οδό γίνεται διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού ενός μορίου. Για τη διαδικασία αυτή απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας η οποία προσφέρεται από τις εξωγενείς πηγές (Ντουνούση *et al.*, 2009).

Ενδογενής οδός

Στις ενδογενείς πηγές περιλαμβάνονται τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα υπεροξειδισώματα (Εικόνα 2). Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται σε αυτή την περίπτωση ως αποτέλεσμα οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, δηλαδή είτε με προσθήκη είτε με αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο. Σε αυτή την περίπτωση δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας και γι' αυτό αποτελεί συχνότερο τρόπο παραγωγής ελεύθερων ριζών (Phaniendra *et. al.*, 2015).

Μιτοχόνδρια

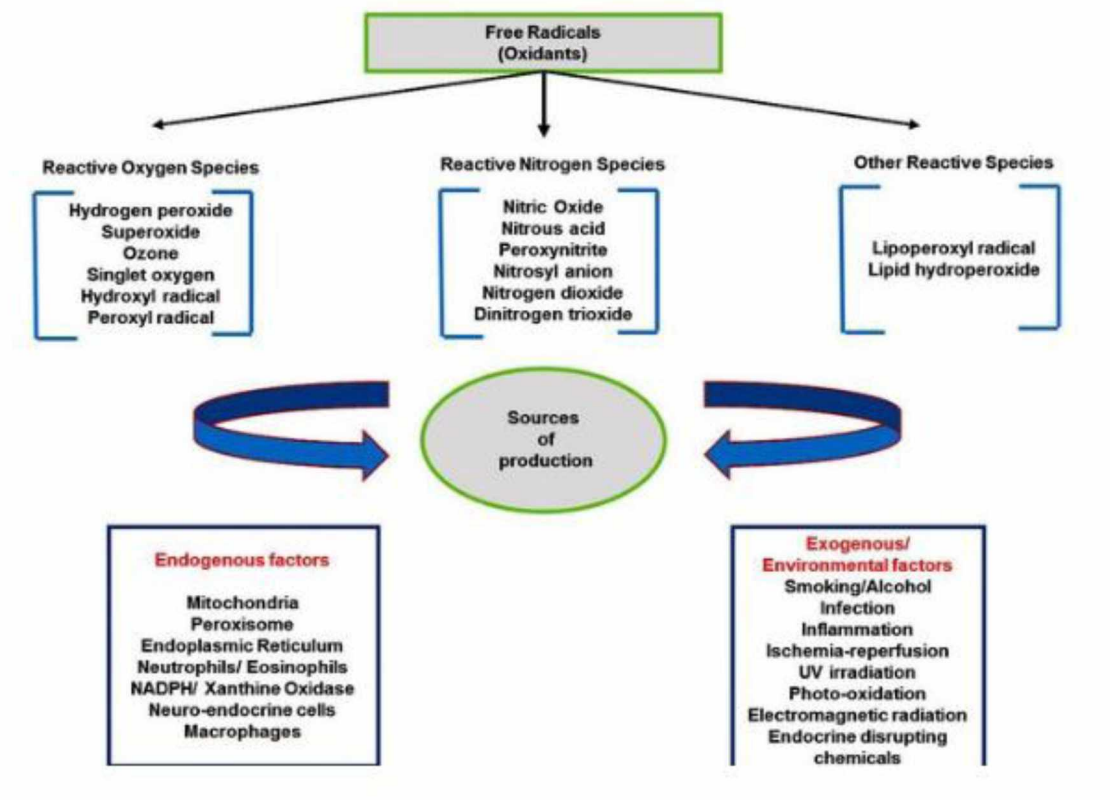
Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κυριότερη ενδογενή πηγή ελεύθερων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, στα μιτοχόνδρια παράγεται η απαιτούμενη ενέργεια για τη λειτουργία του κυττάρου. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον κύκλο του Krebs και την αναπνευστική αλυσίδα και οδηγεί στην παραγωγή 32 μορίων ATP από ένα μόριο γλυκόζης. Για την παραγωγή αυτής της ενέργειας, στο στάδιο της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία αποτελείται από 4 σύμπλοκα, γίνεται αναγωγή μορίων O_2 . Ωστόσο, στα σύμπλοκα I και III συχνά γίνεται μερική αναγωγή του O_2 με αποτέλεσμα να παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου με κυριότερες το ανιόν σουπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Φυσιολογικά, ο οργανισμός διαθέτει τα απαραίτητα ένζυμα για την εξουδετέρωση τους ενώ ένα μικρό ποσοστό ROS όπως προαναφέρθηκε είναι φυσιολογικό και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου. Ωστόσο, είτε λόγω κάποιας παθολογικής κατάστασης είτε λόγω γήρατος μπορεί να αυξηθεί το ποσοστό των ROS που παράγονται μέσω αυτής της διαδικασίας και να συμβάλλει στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες στο κύτταρο (Berg *et al.*, 2012).

Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια τα οποία εντοπίζονται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και κύρια λειτουργία τους είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων και η εξουδετέρωση του H_2O_2 μέσω της δράσης των καταλασών που διαθέτει (Pascual-Ahuir *et al.*, 2017). Παρόλο που οι καταλάσες εξουδετερώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό του H_2O_2 ένα μικρό ποσοστό παραμένει και συμβάλλει στη συσσώρευση ROS στο κύτταρο. Άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται σε αυτά τα οργανίδια είναι η O_2^- , OH^- , και NO^- (Phaniendra *et al.*, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα υπεροξειδιοσώματα παράγουν το 35% των ROS και RNS του κυττάρου .

Ενδοπλασματικό Δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι το οργανίδιο στο οποίο γίνεται η αναδίπλωση των πρωτεϊνών ενώ αποτελεί και σημαντική αποθήκη ασβεστίου του κυττάρου. Κυριότερη αιτία παραγωγής ROS στο ΕΔ είναι η λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών, με το οποίο σχετίζονται κυρίως τα ένζυμα ERO-1 και ERO-2. Επιπλέον τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος p-450 και τα b5 ένζυμα καθώς και η διαμινική οξειδάση παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των ROS. Κυριότερες από τις μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται σε αυτό το οργανίδιο είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το ανιόν σουπεροξειδίου (Bhandary *et al.*, 2012).



Εικόνα 2. Ελεύθερες ρίζες και πηγές ελευθέρων ριζών

1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

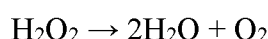
Το οξειδωτικό στρες και οι οξειδωτικοί παράγοντες αποτελούν απειλή για την ομοιόσταση του οργανισμού. Για το λόγο αυτό φαίνεται ότι ο οργανισμός διαθέτει μηχανισμούς προστασίας, γνωστούς και ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας είναι ένα σταθερό μόριο το οποίο αναγνωρίζει μια ελεύθερη ρίζα και της προσφέρει το απαιτούμενο ηλεκτρόνιο για να την εξουδετερώσει (Εικόνα 3), μειώνοντας έτσι την ικανότητά της ρίζας να προκαλέσει βλάβη στα μακρομόρια του κυττάρου (Halliwell, 1995). Δευτερογενώς, έχει διαπιστωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά συνδέονται με καταλύτες των αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό οξειδωτικών παραγόντων (Krinsky, 1992). Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά παράγονται από τον οργανισμό (ενδογενώς) ενώ ορισμένα εισάγονται στον οργανισμό μέσω της τροφής (εξωγενώς) καθώς ο οργανισμός δε μπορεί να τα συνθέσει (Lobo *et al*, 2010). Πιο συγκεκριμένα, οι καταλάσες, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αλλά και η γλουταθειόνη αποτελούν τα πιο γνωστά ενδογενή αντιοξειδωτικά ενώ τα μικροθρεπτικά συστατικά όπως η βιταμίνη Ε, η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) το β-καροτένιο και οι πολυφαινόλες είναι τα πιο γνωστά εξωγενή

αντιοξειδωτικά (Loobo *et al.*, 2010). Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται περαιτέρω με βάση τη δράση τους και μπορούν να διακριθούν κυρίως σε δύο ομάδες: στα προληπτικά αντιοξειδωτικά (ενζυμικά αντιοξειδωτικά) τα οποία καταστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (πρώτη γραμμή προστασίας) και στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες ή σταματούν στην αρχή την αλληλουχία μιας αλυσιδωτής αντίδρασης (δεύτερη γραμμή προστασίας).

Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται κυρίως ένζυμα με χαρακτηριστικά παραδείγματα την καταλάση, την υπεροξειδική δισμουτάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση ήταν το πρώτο αντιοξειδωτικό ένζυμο που χαρακτηρίστηκε και καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Σχήμα 2):



Σχήμα 2. Μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 μέσω της CAT.

Αυτό το ένζυμο εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα των αερόβιων κυττάρων και εξουδετερώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου πριν αυτό διαχυθεί στο κυτταρόπλασμα (Παπαγεωργίου, 2005). Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει περίπου 6 εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο κάθε λεπτό. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλάσης υπάρχει στα κύτταρα του ήπατος και στα ερυθροκύτταρα, ενώ χαμηλά επίπεδα καταλάσης εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς (Eisner and Aneshansley, 1999).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι ένα από τα πιο ισχυρά ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά και καταλύει τη μετατροπή των ανιόντων σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Σχήμα 3):



Σχήμα 3. Μετατροπή των O_2^- σε $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ μέσω της SOD.

Η υπεροξειδική δισμουτάση υπάρχει σε πολλές ισομορφές, ανάλογα με το μέταλλο που απαιτείται ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυμική τους δράση (Παπαγεωργίου, 2005). Υπάρχουν τρεις μορφές SOD στον άνθρωπο: Cu, Zn-SOD που βρίσκεται στο κυτοσόλιο, η Mn-SOD που εδρεύει στο μιτοχόνδριο και η εξωκυτταρική EC-SOD. Η βιοσύνθεση της Cu,Zn-SOD και της EC-SOD είναι συνεχής ενώ η βιοσύνθεση της Mn-SOD είναι επαγόμενη. Η EC-SOD φαίνεται ότι πέραν των ανιόντων σουπεροξειδίου ελαττώνει αποτελεσματικά και το σχηματισμό RNS (Παπαγεωργίου, 2005).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένζυμα που ανάγουν αρκετά οργανικά και ανόργανα υδροϋπεροξείδια προς το σχηματισμό των αντίστοιχων αλκοολών τους. Για την αναγωγή χρησιμοποιούν ως αναγωγικό μέσο κυρίως τη γλουταθειόνη. Κυριότερο υδροϋπεροξείδιο που ανάγεται σε αυτές τις αντιδράσεις είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ενώ αρκετά συχνά ανάγεται και το υδροϋπεροξείδιο των λιπιδίων γεγονός που επιτρέπει την αποκατάσταση βλαβών που έχουν προκληθεί από την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Genestra, 2007).



Σχήμα 4. Μετατροπή των υδροϋπεροξειδίων σε αλκοόλες μέσω των GPx

Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης ανάγεται ξανά οδηγώντας στο σχηματισμό 2 μορίων γλουταθειόνης μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Παπαγεωργίου, 2005).

Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται διάφορες ουσίες με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη γλουταθειόνη, την βιταμίνη C, E και τις πολυφαινόλες.

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και αποτελείται από τέσσερις τοκοφερόλες (α, β, γ, και δ) και τέσσερις τοκοτριονόλες (α,β,γ,δ) (Παπαγεωργίου, 2005). Αυτές οι ενώσεις είναι διαλυτές στα λιπίδια και έχουν έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αντιδρούν ταχύτερα με ρίζες υδροϋπεροξυλίου από ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ως εκ τούτου ενεργούν για να σπάσουν την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Η κύρια λειτουργία της βιταμίνης E είναι η προστασία των λιπιδίων από την υπεροξειδωση και υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η βιταμίνη E και η βιταμίνη C λειτουργούν συνεργιστικά (Nguyen, 2006).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη η οποία καθώς εισέρχεται στον οργανισμό οξειδώνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον παρουσία μεταλλικών ιόντων. Στο τέλος αυτής της οξείδωσης σχηματίζεται το αφυδροασκορβικό οξύ, το οποίο μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω του μεταφορέα γλυκόζης (Παπαγεωργίου, 2005). Το αφυδροασκορβικό οξύ καθώς εισέρχεται στο κύτταρο αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο κύτταρο, και εξουδετερώνει διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Li and Schellhorn, 2007). Επομένως παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου κατά του οξειδωτικού στρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο οργανισμός διαθέτει αυστηρό μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων της βιταμίνης C καθώς αποβάλλει την περίσσεια της μέσω των ούρων (Παπαγεωργίου, 2005).

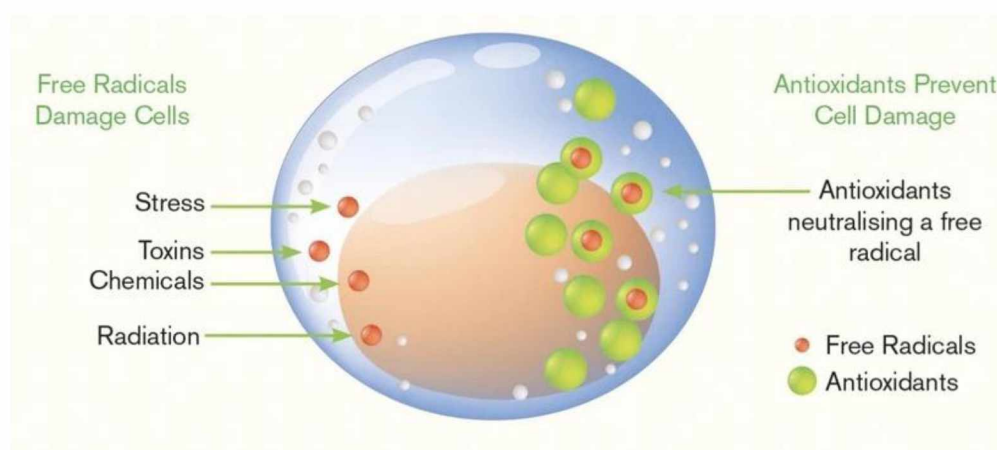
Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη, και είναι ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό. Είναι άφθονο στο κυτοσόλιο, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια, και είναι το κύριο διαλυτό αντιοξειδωτικό σε αυτά τα κυτταρικά διαμερίσματα. Η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης είναι η GSSG, η δισουλφιδική γλουταθειόνη (Bahorun, 2006). Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) συσσωρεύεται μέσα στα κύτταρα και η αναλογία GSH / GSSG είναι ένα καλό

μέτρο του οξειδωτικού στρες ενός οργανισμού (Baharun, 2006). Ο προστατευτικός ρόλος της γλουταθειόνης ενάντια στο οξειδωτικό και το νιτροδωτικό στρες είναι ότι μπορεί να δράσει ως συμπαράγοντας για αρκετά αντιοξειδωτικά ένζυμα, να συμμετάσχει στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της μεμβράνης του πλάσματος, να εξουδετερώσει τη ρίζα υδροξυλίου και του ανιόντος σουπεροξειδίου και να αναγεννήσει τις Βιταμίνες C και E καθιστώντας τις και πάλι ενεργές (Παπαγεωργίου, 2005).

Πέραν των δύο πρώτων γραμμών άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες υπάρχουν και κάποιοι επιπλέον μηχανισμοί άμυνας που αξίζει να αναφερθούν. Πιο συγκεκριμένα, στην τρίτη γραμμή άμυνας υπάγεται η αντιοξειδωτική επιδιόρθωση. Σε αυτή συμμετέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα, πρωτεϊνάσες, πρωτεάσες και πεπτιδάσες, που υπάρχουν στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, αναγνωρίζουν, αποικοδομούν και απομακρύνουν οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες και αποτρέπουν τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Genestra, 2007).

Τα συστήματα επιδιόρθωσης DNA παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο συνολικό αμυντικό σύστημα κατά της οξειδωτικής βλάβης. Είναι γνωστά διάφορα είδη ενζύμων όπως γλυκοσυλάσες και νουκλεάσες, τα οποία επιδιορθώνουν το DNA (Παπαγεωργίου, 2005).



Εικόνα 3. Η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες.

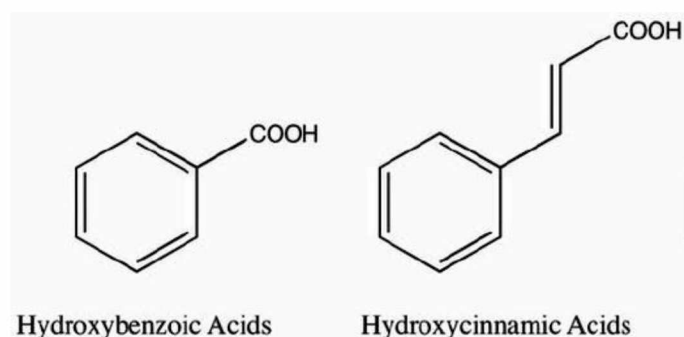
1.4 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης για πολλούς ερευνητές κυρίως λόγω στην αντιοξειδωτική τους δράση αλλά και άλλων βιολογικών τους δράσεων. Βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά καθώς αποτελούν παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους και όπως φαίνεται έχουν ως κύρια δράση την προστασία του φυτού από παθογόνους μικροοργανισμούς. Από τις μέχρι τώρα μελέτες φαίνεται ότι η κατανάλωση πολυφαινολών έχει ευεργετικές ιδιότητες και για τον άνθρωπο καθώς μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προστασία της υγείας του οργανισμού, μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού του και τον έλεγχο της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων μειώνοντας έτσι ενδεχομένως τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου. Πάνω από 8.000 πολυφαινόλες έχουν μέχρι στιγμής εντοπιστεί, αν και οι βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τους στην υγεία δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (Lecour and Lamont, 2011). Μελέτες σε ζώα και ανθρώπους καθώς και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι πληθώρα πολυφαινολών έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που θα μπορούσαν να έχουν προληπτικά ή και θεραπευτικά αποτελέσματα για καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καρκίνο και παχυσαρκία (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011). Η κυρίαρχη εξήγηση για αυτά τα οφέλη υποστηρίζει ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες σχηματίζοντας σταθεροποιημένα χημικά σύμπλοκα, αποτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγούν σε οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο ενώ παράλληλα ενδέχεται να δεσμεύουν μέταλλα όπως Fe^{2+} παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Lecour and Lamont, 2011). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πολυφαινόλες συμβάλλουν επίσης στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών σε καρκινικά κύτταρα και επομένως στον περιορισμό του άμετρου πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Habas *et al.*, 2017). Ωστόσο, η πλειονότητα των στοιχείων προέρχεται από μοντέλα *in vitro* και δεν είναι σαφές εάν αυτοί οι μηχανισμοί ισχύουν για τον άνθρωπο (Habas *et al.*, 2017; Magrone and Jirillo 2012). Ορισμένοι μελετητές έχουν προειδοποιήσει ότι μπορεί να υπάρχουν επιβλαβείς επιπτώσεις από την υπερκατανάλωση πολυφαινολών, ειδικά σε περιπτώσεις που οι ενώσεις προσλαμβάνονται μεμονωμένα και όχι μέσω των τροφίμων (Crowe and Francis 2013; Williamson and Holst 2008).

Από χημικής άποψης οι φυτικές πολυφαινόλες είναι ενώσεις που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο στο μόριο τους συνδεδεμένο με υδροξύλια. Κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή οι λιγνάνες και τα στυλβένια (Παπαγεωργίου, 2005).

Φαινολικά οξέα

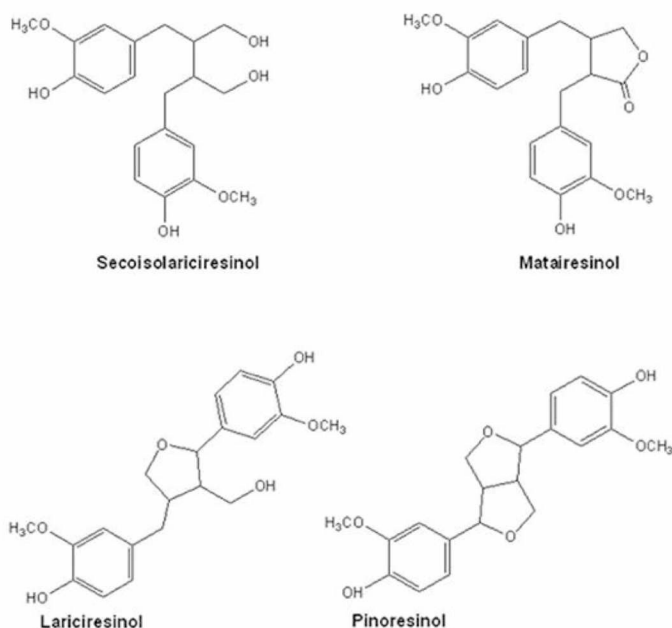
Ο όρος «φαινολικά οξέα» περιγράφει τις φαινολικές ενώσεις που έχουν μία ομάδα καρβοξυλικού οξέος στο μόριο τους. Τα φαινολικά ή φαινολοκαρβοξυλικά οξέα είναι μία από τις κύριες κατηγορίες φυτικών φαινολικών ενώσεων. Βρίσκονται σε ποικιλία φυτικών τροφίμων ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συναντώνται στους σπόρους, στη φλούδα και στα φύλλα διαφόρων λαχανικών (Pereira *et al.*, 2009). Ο ρόλος τους στα φυτά δεν είναι απόλυτα σαφής όμως φαίνεται να σχετίζονται με την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, τη δραστηριότητα των ενζύμων, τη σύνθεση πρωτεϊνών, και τη φωτοσύνθεση. Στα φαινολικά οξέα περιλαμβάνονται κυρίως τα υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και του κινναμωμικού οξέος (Εικόνα 4). Τα φαινολικά οξέα έχουν πολύ υψηλότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τις περισσότερες βιταμίνες (Clifford, 1999). Το πιο άφθονο διαλυτό υδροξυκινναμικό οξύ είναι το χλωρογενικό οξύ (που προκύπτει από την αλληλεπίδραση καφεϊκών και κινικών οξέων) και εντοπίζεται στον καφέ (Kumar and Goel, 2019). Αντίστοιχα, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε διαλυτή μορφή (συζευγμένα με σάκχαρα ή οργανικά οξέα) και συνδέονται με κλάσματα κυτταρικού τοιχώματος ως λιγνίνη. Σε σύγκριση με τα υδροξυκινναμικά οξέα, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται γενικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα φυτά (Kumar and Goel, 2019).



Εικόνα 4. Φαινολικά οξέα, Υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος.

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, με ευρεία εμφάνιση στο φυτικό βασίλειο, και θεωρείται ότι επιδρούν θετικά στην φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο λιναρόσπορο και στο σουσάμι και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σπόρους, φρούτα και λαχανικά. Προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος (Durazzo *et al.*, 2018). Οι κυριότερες ενώσεις λιγνανών είναι η σεκοϊσολαρικρινόλη, η λαρικυρεσινόλη, η μαϊτερεσινόλη, η πενορεσινόλη, η μεριδορεσινόλη και η συριγγαρασινόλη (Εικόνα 6). Από τις λιγνάνες παράγονται στο έντερο των θηλαστικών οι εντερολιγνάνες (μερικές φορές αναφέρονται ως λιγνάνες θηλαστικών). Οι εντερολιγνάνες σε συνδυασμό με κάποιες άλλες ενώσεις της οικογένειας αυτής φαίνεται να έχουν αντικαρκινικές καθώς και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Durazzo *et al.*, 2018).



Εικόνα 6. Παραδείγματα λιγνανών

Στιλβένια

Οι ενώσεις στιλβενίου αποτελούν μέρος μιας μεγάλης ομάδας πολυφαινόλων φυτικής άμυνας που απαντώνται σε πολλά είδη φυτών. Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριϋδροξυ-

trans-στιλβένιο) (Εικόνα 7) είναι το πιο γνωστό στιλβένιο και βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στη φλούδα των σταφυλιών (Reinisalo *et al.*, 2015). Έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των πιθανών οφελειών για την υγεία που σχετίζονται με τις αντιβακτηριδιακές, αντιδιαβητικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες της. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα έχουν επισημάνει ότι και άλλες ενώσεις στιλβενίου όπως η περσστιλβένη (παράγωγο 3,5-διμεθυλαιθέρα της ρεσβερατρόλης) (Εικόνα 7) μπορεί να έχουν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και να έχουν καλύτερη νευροπροστατευτική δράση έναντι του Αλτσχάιμερ από την ίδια τη ρεσβερατρόλη (Reinisalo *et al.*, 2015).

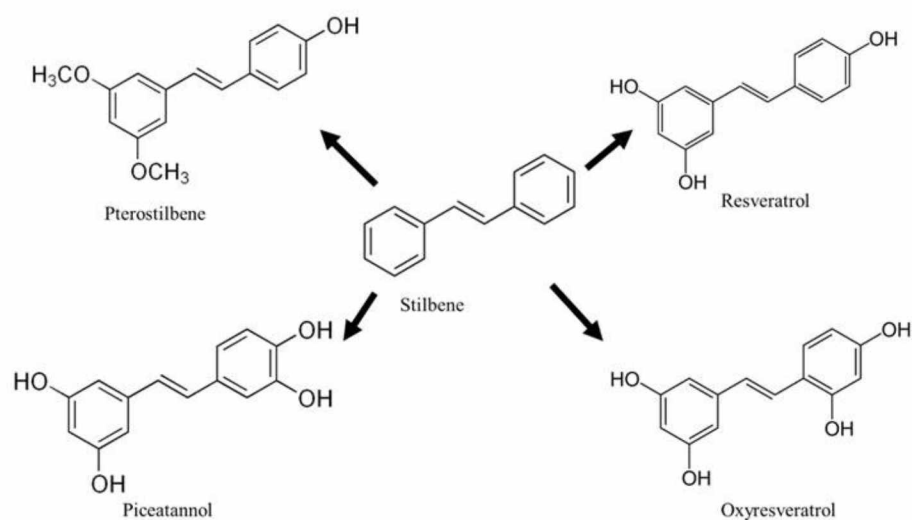


Figure 1: Chemical structure of stilbene and its derivatives

Εικόνα 7. Παραδείγματα Στιλβενίων

1.5 Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*)

Η Ευρωπαϊκή καστανιά (Εικόνα 8) εντάσσεται ταξινομικά στην κλάση των Δικοτυλήδονων, στην τάξη Fagales, στην οικογένεια Fagaceae και στο γένος *Castanea* ενώ είναι γνωστή και ως γλυκιά καστανιά. Είναι ένα δέντρο με μακρά ιστορία καθώς τα πρώτα ευρήματα αξιοποίησης της καστανιάς από τον άνθρωπο χρονολογούνται 5000-6000 χρόνια πριν. Μαζί με την Αμερικανική καστανιά (*Castanea dentata*) την Κινέζικη καστανιά (*Castanea mollissima*) και την Ιαπωνική καστανιά (*Castanea crenata*) αποτελούν τα τέσσερα είδη καστανιάς με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία παγκοσμίως (Conedera *et al.*, 2016).

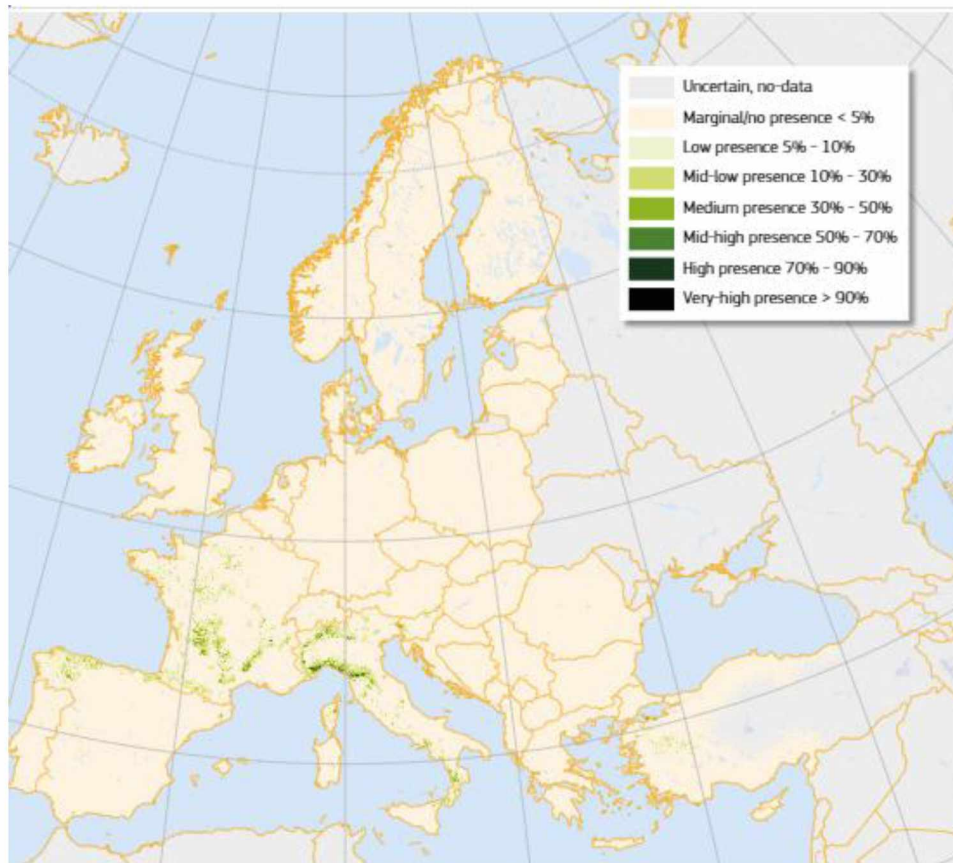


Εικόνα 8. Η ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*)

Κατανομή

Η ευρεία διάδοση και η συνεχής καλλιέργεια της καστανιάς από τον άνθρωπο είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του είδους στα όρια του δυνητικού οικολογικού του εύρους, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευση της αρχικής περιοχής ανάπτυξης του. Πρόσφατα στοιχεία επιβεβαιώνουν όπως αναφέρθηκε την εκμετάλλευση του είδους ήδη από τη νεολιθική εποχή (4.000 π.Χ.) με τα στοιχεία να περιορίζονται σε περιοχές της Ιταλίας (Conedera *et al.*, 2016). Ωστόσο, οι πρώτες σαφείς ενδείξεις για εντατική καλλιέργεια της ευρωπαϊκής καστανιάς εντοπίζονται στη χερσόνησο της Ανατολίας, στη βορειοανατολική Ελλάδα και τη νοτιοανατολική Βουλγαρία και χρονολογούνται το 2.100-2.050 π.Χ. Η σύγχρονη κατανομή της καστανιάς εκτείνεται από τη βορειοδυτική Αφρική προς τη βορειοδυτική Ευρώπη (νότια Αγγλία, Βέλγιο) και από τη νοτιοδυτική Ασία (Τουρκία) έως την ανατολική Ευρώπη (Ρουμανία), τον Καύκασο και την Κασπία Θάλασσα. Στην Ευρώπη, η συνολική έκταση της καλλιέργειας είναι περίπου 2,5 εκατομμύρια εκτάρια ενώ τα περισσότερα δάση καστανιάς (89%) είναι συγκεντρωμένα στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Ιβηρική χερσόνησο (Εικόνα 9). Είναι άξιο αναφοράς ότι, τα τελευταία χρόνια η ετήσια παραγωγή κάστανων έχει αυξηθεί με κυριότερες χώρες παραγωγής την Ιταλία (35%) την Ελλάδα (24%) και την Πορτογαλία (19%). Όσον αφορά το υψόμετρο, η ευρωπαϊκή καστανιά συναντάται κυρίως σε

υψόμετρο μεταξύ 200 και 1.800 m, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής στην οποία καλλιεργείται (Avanzato, 2009). Όσο μεγαλύτερο το γεωγραφικό πλάτος τόσο μικρότερο το υψόμετρο στο οποίο ευδοκίμει και αντίστροφα. Στην Ελλάδα καλλιέργειες Ευρωπαϊκής καστανιάς συναντώνται κυρίως στη Θεσσαλία και στην Πελοπόννησο αλλά και στην Κρήτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι ευρωπαίοι άποικοι εισήγαγαν το είδος και σε άλλες ηπείρους, έτσι το είδος εντοπίζεται σήμερα σε διάφορα μέρη της Νότιας και Βόρειας Αμερικής, καθώς και στην Αυστραλία (Avanzato, 2009).



Εικόνα 9. Η σύγχρονη κατανομή της Ευρωπαϊκής καστανιάς στην Ευρώπη

Χαρακτηριστικά

Η γλυκιά καστανιά είναι φυλλοβόλο δέντρο μεσαίου μεγέθους που μπορεί να φτάσει τα 30-35 m ύψος και τα 2 μέτρα πλάτος. Το δέντρο μπορεί να επιβιώσει έως και 1000 χρόνια ενώ ο μέσος όρος ζωής του είναι τα 500 χρόνια. Ο φλοιός έχει καφέ-γκριζωπό χρώμα. Τα φύλλα είναι επιμήκη-λογχοειδή, ενώ έχουν πριονωτές παρυφές και μυτερές άκρες. Το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 8-25 cm, και το πλάτος κυμαίνεται μεταξύ 5-9 cm (Εικόνα 10). Αυτό το είδος δένδρων είναι μόνοικο διαθέτει δηλαδή τόσο

αρσενικά όσο και θηλυκά άνθη τα οποία αναπτύσσονται στα τέλη Ιουνίου έως τον Ιούλιο και ενδέχεται να επικονιαστούν από τον άνεμο κυρίως σε ξηρές συνθήκες κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας, ή από έντομα, κυρίως σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας. Τα άνθη σχηματίζουν σταχύμορφη ταξιανθία (ίουλοι) με τα αρσενικά άνθη να εντοπίζονται στη ράχη της ταξιανθίας και τα θηλυκά στη βάση αυτής (Εικόνα 10α). Μέχρι το φθινόπωρο τα θηλυκά άνθη σχηματίζουν ένα ακανθώδες περίβλημα που περιέχει 3-7 κάστανα (Εικόνα 10β) τα οποία ωριμάζουν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου κυρίως το Σεπτέμβριο και τον Οκτώβριο (Conedera *et al.*, 2016).



Εικόνα 10α,β. α) Τα φύλλα, η ταξιανθία και β) ο καρπός της ευρωπαϊκής καστανιάς.

Ευνοϊκές συνθήκες

Η Ευρωπαϊκή καστανιά είναι ένα είδος που ευδοκimeί σε εύκρατο κλίμα, με ιδανική μέση ετήσια θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 8 ° και 15 ° C και μηνιαίες μέσες θερμοκρασίες άνω των 10 ° C. Για την ανάπτυξη του είδους απαιτείται μια ελάχιστη βροχόπτωση που κυμαίνεται μεταξύ 600 και 800 mm ανάλογα με το υψόμετρο και το γεωγραφικό πλάτος στο οποίο βρίσκεται. Το δέντρο της καστανιάς εμφανίζει υψηλή

ευαισθησία στην ξηρασία κατά τους θερινούς μήνες που προκαλούνται από το συνδυασμό υψηλών θερμοκρασιών και έλλειψης βροχοπτώσεων (Conedera *et al.*, 2016). Δεν ευδοκιμεί σε ασβεστολιθικά εδάφη ενώ προτιμά αποστραγγισμένα εδάφη με όξινο έως ουδέτερο pH (συνήθως 5-6). Αναπτύσσεται ιδανικά σε συνθήκες φωτός και ημι-σκιάς. Είναι ένα είδος ευαίσθητο στον παγετό και είναι πολύ προσαρμοσμένο στις διαταραχές της πυρκαγιάς (Conedera *et al.*, 2016).

Χρήσεις και βιοδραστητικότητα

Η ευρωπαϊκή καστανιά ήδη από το παρελθόν αξιοποιούνταν για διάφορους σκοπούς, με κυριότερους την εμπορία ξυλείας και κάστανων, την απομόνωση των τανινών, που διαθέτει, για φαρμακευτικούς σκοπούς αλλά και την παραγωγή μελιού από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις του φυτού. Το κάστανο χρησιμοποιείται εδώ και αρκετούς αιώνες ως πηγή τροφής σε αγροτικές περιοχές της Ευρώπης (Rodrigues *et al.*, 2020). Στο παρελθόν, το κάστανο αποτελούσε σημαντική πηγή ενέργειας και πρωτεϊνών στη διατροφή οικονομικά ασθενέστερων πληθυσμών. Είναι ένας καρπός χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, πλούσιος σε μέταλλα και βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη E), ενώ διαθέτει και υψηλά επίπεδα υγρασίας (40-50%) καθώς και σημαντικές ποσότητες φυτικών ινών και αμύλου (Košňovská, 2013). Επιπλέον, το κάστανο περιέχει φωσφολιπίδια, στερόλες και λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα λινολεϊκό οξύ που είναι γνωστό για την αγγειοπροστατευτική του δράση (Rodrigues *et al.*, 2020). Παράλληλα, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο και υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο, φώσφορο και μαγνήσιο (Košňovská, 2013). Εκτός από αυτές τις ιδιότητες, το κάστανο περιέχει πολυφαινόλες (10-19 mg/g) με κυρίαρχες το γαλλικό (φαινολικό οξύ) και το ελλαγικό οξύ (φαινόλη) καθώς και τανίνες, όπως ήδη αναφέρθηκε. Βάσει των συστατικών του το κάστανο φαίνεται να έχει πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων. Ιδιαίτερα η περιεκτικότητα του καρπού σε πολυφαινόλες έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την προστασία από νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο αλλά και από καρδιαγγειακά νοσήματα (Dinis *et al.*, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πέραν του καρπού πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες είναι και τα φύλλα της καστανιάς καθώς και το εσωτερικό κέλυφος του καρπού. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα παραπροϊόντα τα οποία στο παρελθόν έμεναν αναξιοποίητα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και ειδικότερα σε φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό οξύ και το βανιλικό οξύ, φλαβονόλες με κυριότερες την κερκετίνη και τη μυρικετίνη

καθώς και τα παράγωγα τους. Πέραν της αντιοξειδωτικής τους δράσης αυτά τα παραπροϊόντα εμφανίζουν και αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε gram+ βακτηρίων και σε ορισμένα gram- (Dinis *et al.*, 2012).

Η σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο του καρπού όσο και των παραπροϊόντων του καθιστά σημαντική την περαιτέρω μελέτη των δυνητικών προστατευτικών και ευεργετικών ιδιοτήτων τους για την υγεία του ανθρώπου.

1.6 Μυϊκά κύτταρα και οξειδωτικό στρες

Ο σκελετικός μυς είναι ένας ιστός που παράγει συνεχώς δραστικές μορφές οξυγόνου αλλά και αζώτου, οι οποίες είναι σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Η παραγωγή ROS είναι μια φυσιολογική διαδικασία όπως αναφέρθηκε παραπάνω που συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων των σκελετικών μυών, μέσω της οποίας τα ROS λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης και ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια απαραίτητα για τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Kramer *et al.*, 2015). Η ανισορροπία που προκαλείται από την αύξηση των επιπέδων των οξειδωτικών παραγόντων ή / και τη μείωση των αντιοξειδωτικών του κυττάρου προκαλεί την εμφάνιση οξειδωτικού στρες, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία των μυών. Κυριότερες πηγές παραγωγής των ROS στα μυϊκά κύτταρα είναι τα μιτοχόνδρια, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και το σαρκείλημα (Ábrigo *et al.*, 2016). Επιπλέον, τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS υπό φυσιοπαθολογικές συνθήκες είναι η οξειδάση του νικοτιδάμινο αδένινο φωσφορικό δινουκλεοτιδίου (NADPH) και η οξειδάση της ξανθίνης (XO). Επίσης τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που δρουν ενάντια στα ROS στα μυϊκά κύτταρα είναι η SOD, η CAT και οι GPx. Κυριότερες αιτίες πρόκλησης οξειδωτικού στρες στα μυϊκά κύτταρα είναι η έντονη άσκηση αλλά και διάφορες παθήσεις όπως η μυϊκή δυστροφία, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια αλλά και η ισχαιμία (Ábrigo *et al.*, 2016).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από τον καρπό της Ευρωπαϊκής καστανιάς, από την περιοχή της Μελιβοίας του νομού Λάρισας, στην κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού C2C12. Επιπλέον, μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα του κάστανου ενσωματωμένα σε οροπρωτεΐνη.

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1Απομόνωση εκχυλισμάτων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από κάστανα του είδους *Castanea sativa mill* (Ευρωπαϊκής καστανιάς). Η διαδικασία αυτή ολοκληρώθηκε σε προηγούμενη μελέτη. Οι εκχυλίσσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 49 °C, με αναλογία στερεού-υγρού 1:13,5, με διαλυτή ουσία το νερό και χρόνο εκχύλισης τα 60 λεπτά. Οι εκχυλίσσεις έγιναν σε βιομηχανικού τύπου εκχυλιστήρα (microwave assistant extraction, MAE). Μετά το πέρας της εκχύλισης σε ορισμένα δείγματα ακολούθησε η διαδικασία της ενθυλάκωσης, με μέσο ενθυλάκωσης την πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Τα ενθυλακωμένα δείγματα περιείχαν 10% εκχύλισμα φύλλων καστανιάς και 90% οροπρωτεΐνη γάλακτος. Μέσω της ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται η προστασία των βιοδραστικών μορίων των εκχυλισμάτων από πιθανές οξειδώσεις ώστε να ενισχύεται η βιοδιαθεσιμότητά τους. Τα εκχυλίσματα του καρπού και τα ενθυλακωμένα παράγωγα αυτών αποξηράθηκαν μέσω της συσκευής freeze drying και αξιοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

3.2Καλλιέργεια κυττάρων

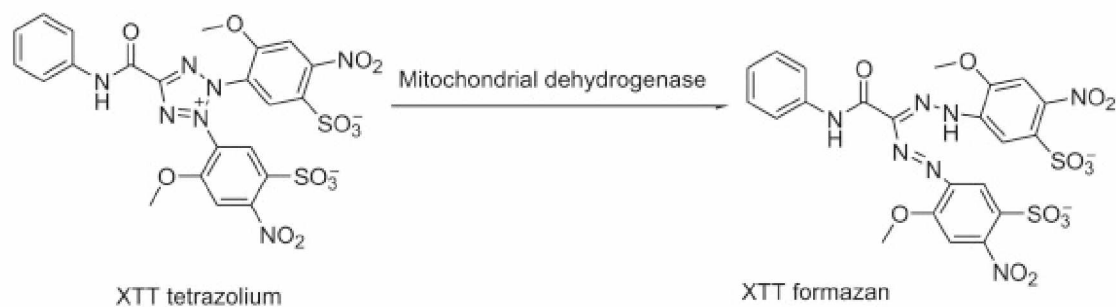
Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν τα μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 (μυοβλάστες ποντικού) τα οποία παρήχθησαν από τους Blau et al. το 1985 και αποτελούν υποκλώνο των μυοβλαστών που παρήχθησαν από τους Yaffe και Saxel.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες πολυστυρενίου 25cm² ειδικές για την καλλιέργεια κυττάρων. Για την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM (5mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) και αντιμυκητιασικό (στρεπτομυκίνη). Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης σε θερμοκρασία 37°C και σε CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% ορό (FBS) μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι κατά 70% πλήρης από κύτταρα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με αποκόλληση των κυττάρων με 0,5 mL τρυψίνης (0,25%). Η επώαση στην τρυψίνη είχε διάρκεια περίπου 1-2 λεπτά στους 37°C και ακολούθησε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με ορό (10% FBS). Η

καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.3 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των δύο εκχυλισμάτων μέσω XTT

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμασία μέσω της οποίας καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας διαφόρων ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην διάσπαση του τετραμμωνιακού άλατος XTT, παρουσία ενός αντιδραστηρίου σύζευξης ηλεκτρονίων, και στο σχηματισμό ενός υδατοδιαλυτού άλατος, της φορμαζάνης (Εικόνα 11). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο από μιτοχονδριακές δευδρογονάσες. Η φορμαζάνη έχει πορτοκαλί χρώμα και ποσοτικοποιείται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (450-500nm). Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση. Επομένως, η μετρούμενη απορρόφηση σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων. Στην παρούσα εργασία η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου έγινε προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή τοξική δράση των εκχυλισμάτων οροπρωτεΐνη κάστανου και καρπού κάστανου σε διάφορες συγκεντρώσεις (125 μμ, 250 μg/ml, 500 μg/ml, και 1mg/ml) στα υπό μελέτη κύτταρα, αλλά και να επιλεγούν οι τελικές συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιούνταν στα πειράματα.



Εικόνα 11. Η μετατροπή του τετραμμωνιακού άλατος σε φορμαζάνη από δευδρογονάσες του μιτοχονδρίου

Το πείραμα σε κάθε περίπτωση είχε διάρκεια τριών ημερών. Πιο συγκεκριμένα, την πρώτη ημέρα πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης, συγκέντρωση τους σε falcon, αραιώση τους (1:2) και καταμέτρηση τους με τη χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, σε

κάθε πηγαδάκι πλάκας με 96 πηγαδάκια (96-well plate) προστέθηκαν 100μL από τα κύτταρα ώστε σε κάθε ένα να υπάρχουν 10^4 κύτταρα. Η πλάκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο επώασης στους 37°C και στο σκοτάδι για περίπου 24ώρες (overnight). Τη δεύτερη ημέρα πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού από τα πηγαδάκια και πλύση με 100μL PBS και στη συνέχεια προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων στο εκάστοτε πηγαδάκι (125 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml, και 1mg/ml) (Η σκόνη του κάθε εκχυλίσματος είχε διαλυθεί σε θρεπτικό χωρίς ορό). Η πλάκα τοποθετήθηκε ξανά στον κλίβανο επώασης για 24 ώρες. Την τρίτη ημέρα προστίθεται στο εκάστοτε πηγαδάκι 50μL διαλύματος XTT reagent/ electron coupling reagent (αναλογία 50:1) και γίνεται επώαση της πλάκας στον κλίβανο για 4 ώρες. Μετά το πέρας αυτών των ωρών πραγματοποιείται μέτρησης της απορρόφησης της πλάκας στα 450nm από το φασματοφωτόμετρο Elisa Plate Reader της Biotek και με τη βοήθεια του προγράμματος Gen5. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές για κάθε συγκέντρωση και σε κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε τρεις φορές. Η % αναστολή των δυο εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση της κυτταρικής σειράς C2C12 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

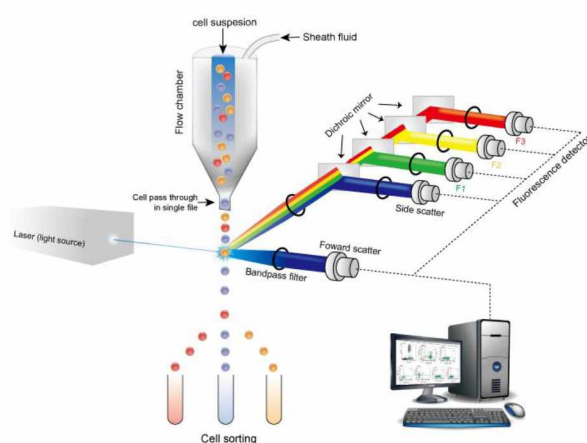
Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η οροπρωτεΐνη κάστανου δεν εμφάνισε τοξική δράση μετά από 24h έκθεση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις και για αυτό επιλέχθηκε ως υψηλότερη συγκέντρωση το 1mg/mL. Όσον αφορά στον καρπό κάστανου παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση στην οποία εμφανιζόταν ήπια τοξική δράση ήταν τα 250μg/ml και γιαυτό επιλέχθηκε αυτή ως υψηλότερη συγκέντρωση.

3.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του κυττάρου αλλά και άλλων

σωματιδίων (πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.). Τα σωματίδια διέρχονται από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Μέσω αυτής της τεχνικής δίνεται η δυνατότητα μέτρησης και ανάλυσης πολλαπλών χαρακτηριστικών του σωματιδίου όπως είναι το μέγεθος του κυττάρου ή εσωτερική του πολυπλοκότητα και η ένταση του φθορισμού του. Επιπλέον, ιδιαίτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη ταχύτητα με την οποία γίνεται η ανάλυση του δείγματος. Η αρχή λειτουργίας του κυτταρομέτρου (Εικόνα 12) στηρίζεται στην υδροδυναμική εστίαση μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η κίνηση των κυττάρων σε νηματική ροή δίνοντας τη δυνατότητα στη δέσμη φωτός να προσπίπτει σε ένα κύτταρο ή σε μικρό αριθμό κυττάρων τη φορά. Καθώς η δέσμη φωτός προσπίπτει στο υπό μελέτη σωματίδιο γίνεται εμπρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός καθώς και φθορισμός. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).



Εικόνα 12. Κυτταρόμετρο ροής

Απαραίτητη προϋπόθεση για να μελετηθεί ένα σωματίδιο στο κυτταρόμετρο ροής είναι να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος. Όπως αναφέρθηκε, καθώς προσπίπτει το φως στο σωματίδιο λαμβάνονται 4 φωτεινά σήματα: το εμπρόσθιο σκεδαζόμενο φως (FSC), το πλευρικό σκεδαζόμενο φως (SSC) και ο παραγόμενος φθορισμός. Ο

συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα σήματα αυτά στη συνέχεια ταξινομούνται και καταχωρούνται στους υπολογιστές. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα μελέτης μεγάλου αριθμού κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων. Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, μπορούν να αποκτήσουν εκλεκτικά φορτίο και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές Thiol-Green dye και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική Thiol-Green dye συνδέεται με τις θειόλες του κυττάρου συμπεριλαμβανομένης της GSH και κατά τη σύνδεση φθορίζει. (Intracellular GSH Assay Kit).

Η DCF-DA ακολουθεί ένα διαφορετικό τρόπο δράσης. Πιο συγκεκριμένα, αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες και οδηγεί στο σχηματισμό μιας μη φθορίζουσας ένωσης, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS και σχηματίζει τη φθορίζουσα ένωση DCF. Η DCF συνδέεται μη ειδικά με τις ROS με αποτέλεσμα να συμβάλλει στην αποτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μέσω του κυτταρομέτρου (Vael et al., 2007).

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός των ROS και της GSH έγινε βάσει του πρωτοκόλλου του Gkoutzourelas et al. (2014). Την πρώτη ημέρα έγινε επίστρωση των κυττάρων σε πλάκες με 6 πηγαδάκια (6-well plate). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αρχικά τρυψινοποίηση για να ανακτηθούν τα κύτταρα και στη συνέχεια προστέθηκαν 400μL από το διάλυμα των κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνταν 4 πλάκες. Μια για τον προσδιορισμό των ROS και μια για τον προσδιορισμό της GSH για κάθε ένα εκχύλισμα. Οι πλάκες διατηρήθηκαν στον κλίβανο επώασης καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight incubation).

Τη δεύτερη ημέρα πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού, πλύση με 0,5ml PBS και προσθήκη των εκχυλισμάτων στις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν από την XTT (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1mg/mL για την οροπρωτεΐνη κάστανου, 31 µg/ml, 62 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml για τον καρπό του κάστανου).

GSH

Μετά το πέρας 24 ωρών υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων και στη συνέχεια τριψινοποίηση και τοποθέτηση του διαλύματος των κυττάρων σε eppendorf. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων 1200 στροφές στους 37 °C για 5 λεπτά. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του υπερκειμένου και διατήρηση του ιζήματος το οποίο επαναιωρήθηκε σε κάθε περίπτωση σε 400 µL PBS και έγινε προσθήκη 5µL χρωστικής thiol green dye. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 37°C για 30 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές, στους 4 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400µL PBS και τοποθετήθηκε στα σωληνάκια του κυτταρόμετρου.

ROS

Αντίστοιχα για τον υπολογισμό των ROS μετά το πέρας των 24 ωρών, ακολούθησε πλύση ώστε να γίνει απομάκρυνση του εκχυλίσματος και στη συνέχεια προσθήκη θρεπτικού DMEM με τη χρωστική DCF-DA (10 µM) διαλυμένη σε PBS από αρχικό στοκ 20mM της χρωστικής διαλυμένης σε DMSO. Η επώαση διήρκησε 45 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 37°C (κλίβανος επώασης). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τρυψινοποίηση των κυττάρων και επαναιώρηση τους σε 800µL PBS. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση 1200 στροφές, στους 4 °C για 5 λεπτά. Το ίζημα αραιώθηκε σε 400µL PBS και τοποθετήθηκε στα σωληνάκια του κυτταρόμετρου.

Έπειτα, ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων από το κυτταρόμετρο με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 490 και 520 nm για την GSH. Επίσης, μετρήθηκαν η εμπρόσθια (FSC) και πλευρική (SSC) σκέδαση του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Οι αναλύσεις υπολογίστηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού

μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson).

3.5 Προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford Αρχή της μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Bradford το 1976 και αποσκοπεί στον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης του υπό μελέτη δείγματος μέσω της αλληλεπίδρασης του με το ομώνυμο αντιδραστήριο (αντιδραστήριο Bradford). Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford προσδένεται στην πρωτεΐνη του δείγματος και κυρίως σε ορισμένα αμινοξέα, ιδιαίτερα στην αργινίνη, σχηματίζοντας ένα χρωμογόνο σύμπλοκο μπλε χρώματος. Αυτός ο σχηματισμός του συμπλόκου αποτυπώνεται φασματοφωτομετρικά με μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει τα αποτελέσματα του πειράματος να συγκριθούν με μια πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης, συνήθως χρησιμοποιείται η αλβουμίνη ώστε να προσδιοριστεί η ολική ποσότητα της πρωτεΐνης του δείγματος.

Πειραματική διαδικασία

Σε 20 μ l δείγματος προστέθηκε 1 mL του αντιδραστηρίου Bradford, ενώ για το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 20 μ l PBS. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Ο υπολογισμός της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όπως προαναφέρθηκε στα 595 nm. Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης έγινε με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης.

3.6. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μέσω του υπολογισμού της ρίζας DPPH.

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο DPPH όπως προτάθηκε από τους Janaszewska and Bartosz (2002). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ιδιότητα της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) να ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) παρουσία αντιοξειδωτικού μορίου. Το αντιοξειδωτικό μόριο λειτουργεί ως δότης ενός ατόμου υδρογόνου στη DPPH[•] οδηγώντας στο σχηματισμό της DPPH-H. Ο υπολογισμός της DPPH πραγματοποιείται με τη βοήθεια

φασματοφωτόμετρου στα 520 nm. Επομένως, παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα αναμένεται ότι η τιμή της TAC θα είναι μειωμένη συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή του δείγματος μάρτυρα που περιέχει μόνο DPPH.

Πειραματική διαδικασία

Την πρώτη ημέρα πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια των κυττάρων σε φλάσκες πολυστυρενίου 25cm². Τη δεύτερη ημέρα αφότου έγινε πλύση της εκάστοτε φλάσκας τοποθετήθηκε σε κάθε μια από αυτές θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό και έγινε επώαση των κυττάρων στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Μετά το πέρας 24 ωρών ακολούθησε αποκόλληση των κυττάρων με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης και επαναιώρηση τους σε θρεπτικό υλικό DMEM με ορό. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 300g, στους 4oC για 10 λεπτά. Έπειτα, ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου, πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:3 (0,01M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4oC για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 300μl PBS (0,01 M με pH 7,4) στο οποίο είχαν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Aprotinin-EDTA-PMSF, SigmaAltrich). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σύστημα υπερήχων με σκοπό τη λύση των κυττάρων. Μετά τη λύση των κυττάρων ακολούθησε φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων για 15min σε 10.000 rcf και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω μελέτη των φασματοφωτομετρικών δεικτών. Πιο συγκεκριμένα, με την μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κυτταρικού εναιωρήματος όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονταν 100μl κυτταρικού αιωρήματος, 400μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (10 mM με pH 7.4) και 500 μl της ρίζας DPPH[•] (50 μM). Το τυφλό περιείχε 400μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (10 mM με pH 7.4), 100μl διαλύματος PBS με αναστολείς πρωτεασών και 500 μl της ρίζας DPPH[•] (50 μM). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και επωάστηκαν στο σκοτάδι για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά σε 15.000 στροφές και διατηρήθηκε το υπερκείμενο ώστε να γίνει μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου σε μήκος κύματος απορρόφησης 520 nm. Για κάθε δείγμα το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.

Υπολογισμοί

Η TAC υπολογίζεται σε $\mu\text{g/mlol}$ της ρίζας DPPH' που ανάγεται σε DPPH-H από τα αντιοξειδωτικά μόρια των δειγμάτων ανά mg πρωτεΐνης που περιέχεται σε κάθε δείγμα, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TAC } (\mu\text{g/mlol DPPH'}/\text{mg πρωτεΐνης}) = [(A_{\text{τυφλού}} - A_{\text{δείγματος}}) / (A_{\text{τυφλού}}) \times 0,05 \times 10] / C_{\delta},$$

όπου $A_{\text{τυφλού}}$ είναι η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα, $A_{\text{δείγματος}}$ η μέση τιμή απορρόφησης του εξεταζόμενου δείγματος, 0,05 η τελική συγκέντρωση της ρίζας DPPH' στο 1 mL της αντίδρασης, 10 ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (τελικός όγκος της αντίδρασης/ μl αιωρήματος, $1000\mu\text{l}/100\mu\text{l}$) και C_{δ} η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mg/mL) όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

3.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με one-way ANOVA ανάλυση για να προσδιοριστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων και τη δοκιμασία Tukey για να προσδιοριστεί μεταξύ ποιων ομάδων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε τιμές $p < 0,05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (SD, Standard Deviation).

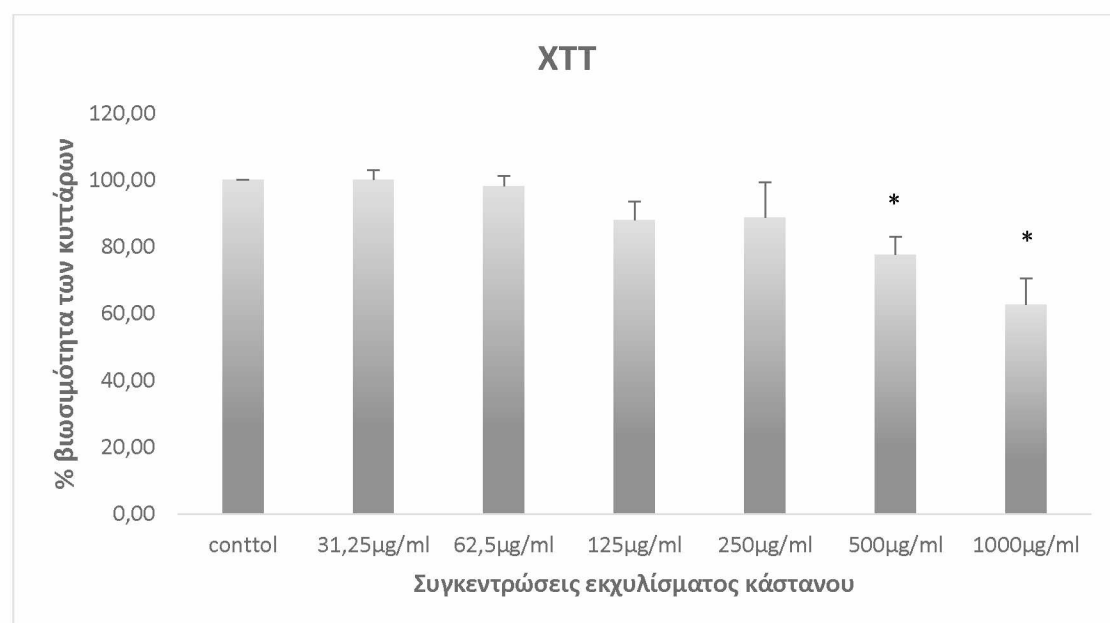
4. Αποτελέσματα

4.1 Επίδραση των εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 (XTT)

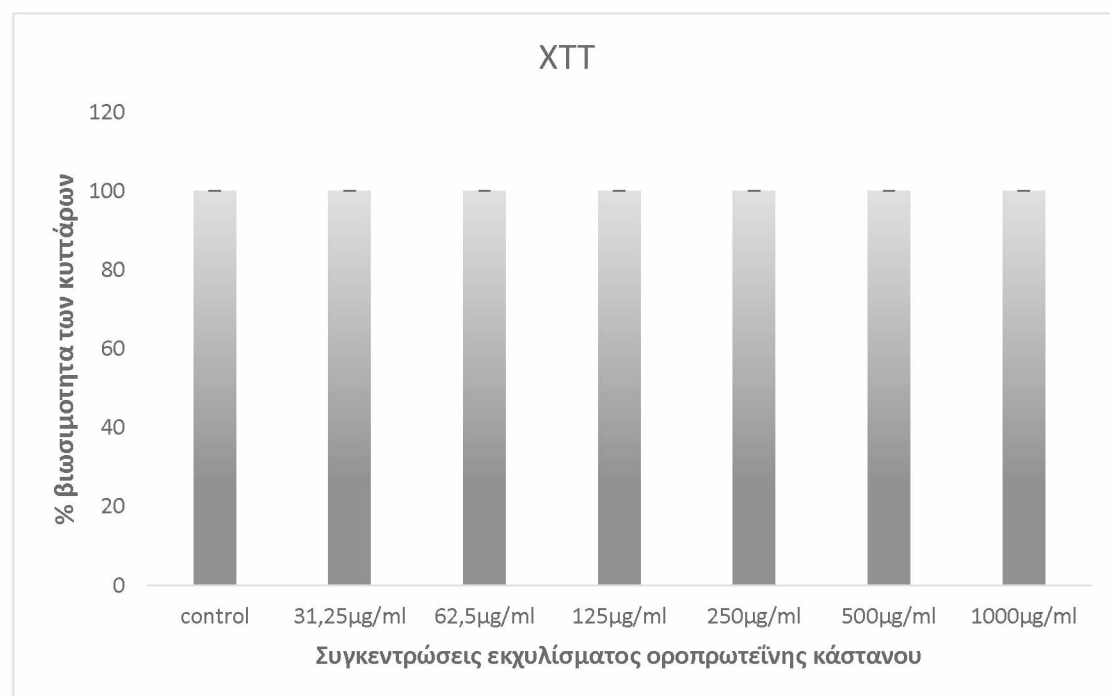
Στα διαγράμματα 1 και 2 παρατηρείται η επί τοις εκατό αναστολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12 μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος ($31,25 \mu\text{g/ml}$, $62,5 \mu\text{g/ml}$, $125 \mu\text{g/ml}$, $250 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $1000 \mu\text{g/ml}$).

Παρουσία του εκχυλίσματος κάστανου σε συγκεντρώσεις έως και $250 \mu\text{g/ml}$ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική κυτταροτοξικότητα (Διάγραμμα 1). Επομένως, οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν στην παρούσα εργασία είναι οι ακόλουθες $31,25 \mu\text{g/ml}$, $62,5 \mu\text{g/ml}$, $125 \mu\text{g/ml}$ και $250 \mu\text{g/ml}$.

Αντίστοιχα, παρουσία του εκχυλίσματος οροπρωτεΐνης κάστανου παρατηρείται ότι δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2 η αναστολή της βιωσιμότητας παραμένει στατιστικά μη σημαντική ακόμη και υπό την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (1000 $\mu\text{g/ml}$). Επομένως σε αυτή την περίπτωση οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν είναι οι ακόλουθες: 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$.



Διάγραμμα 1. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος κάστανου (31,25μg/ml, 62,5μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 1000μg/ml).



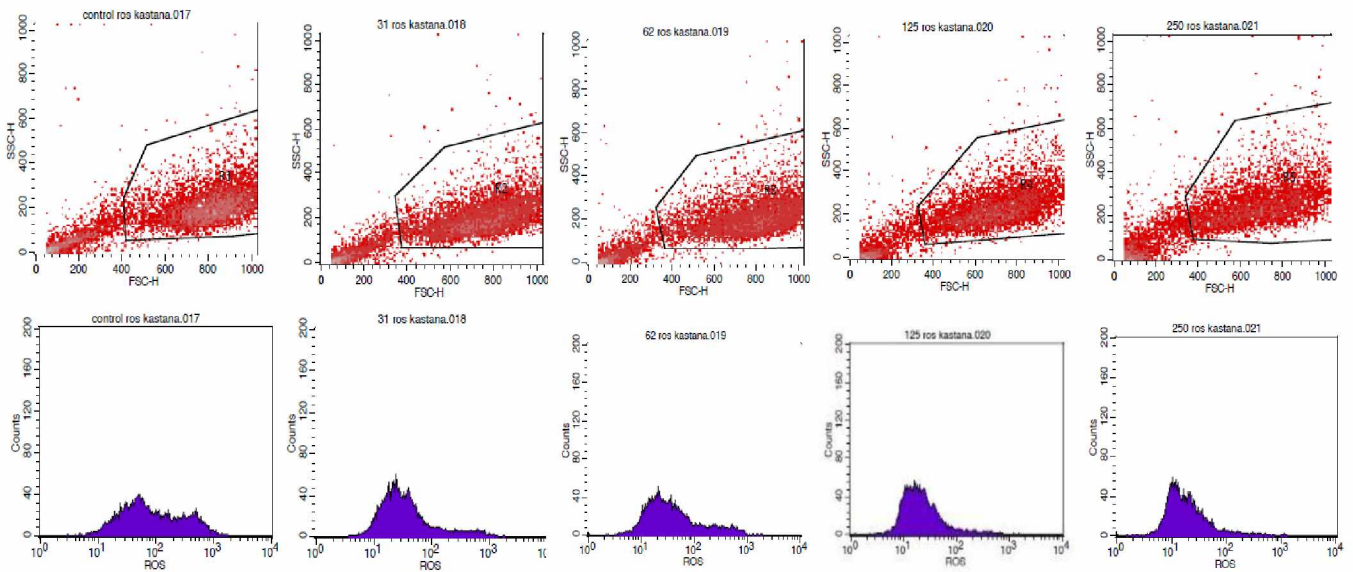
Διάγραμμα 2. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος οροπρωτεΐνης κάστανου 31,25μg/ml, 62,5μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 1000μg/ml).

4.2 Επίδραση των εκχυλίσμάτων στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS, σε μυϊκά κύτταρα C2C12.

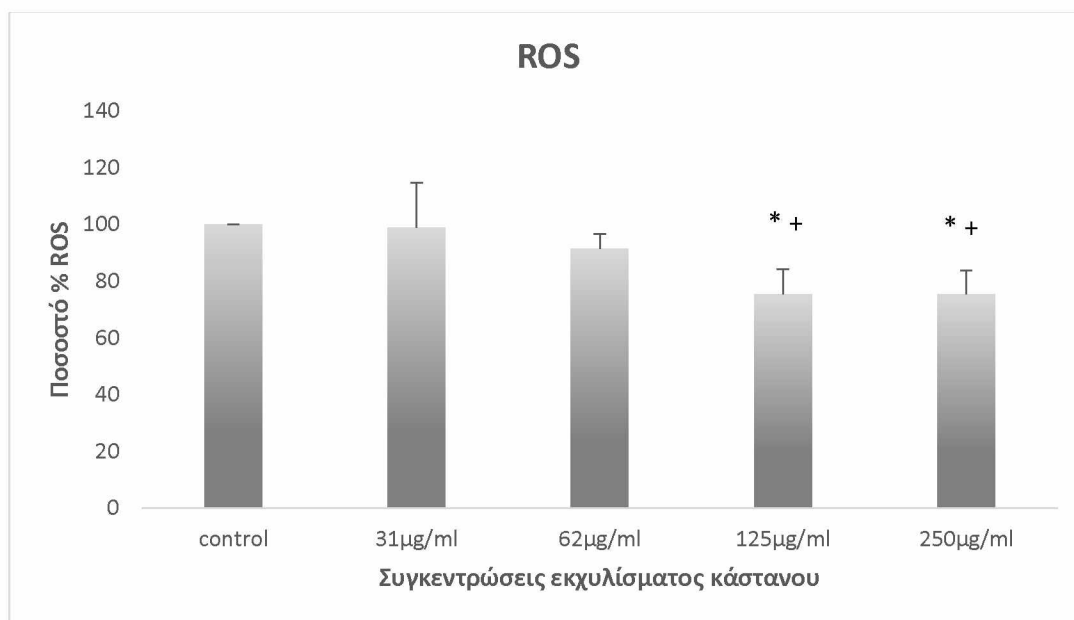
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα επίπεδα των ROS σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12 μετά από 24ώρη έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα δύο εκχύλισμα (διάγραμμα 3 σε εκχύλισμα κάστανου, διάγραμμα 4 σε ενθυλακωμένο εκχύλισμα). Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ROS σε δείγμα control-κύτταρα ελέγχου και σε 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για κάθε εκχύλισμα όπως καθορίστηκε από τη δοκιμασία XTT. Τα διαγράμματα 3,4 προέκυψαν από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής όπως φαίνονται στο γράφημα 1 και 2 αντίστοιχα.

Για το εκχύλισμα κάστανου χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 31,25μg/ml, 62,5μg/ml, 125μg/ml και 250μg/ml. Βάσει του διαγράμματος 3 παρατηρείται ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 125 μg/ml και 250μg/ml εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των ROS τόσο σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου όσο και σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 31,25μg/ml.

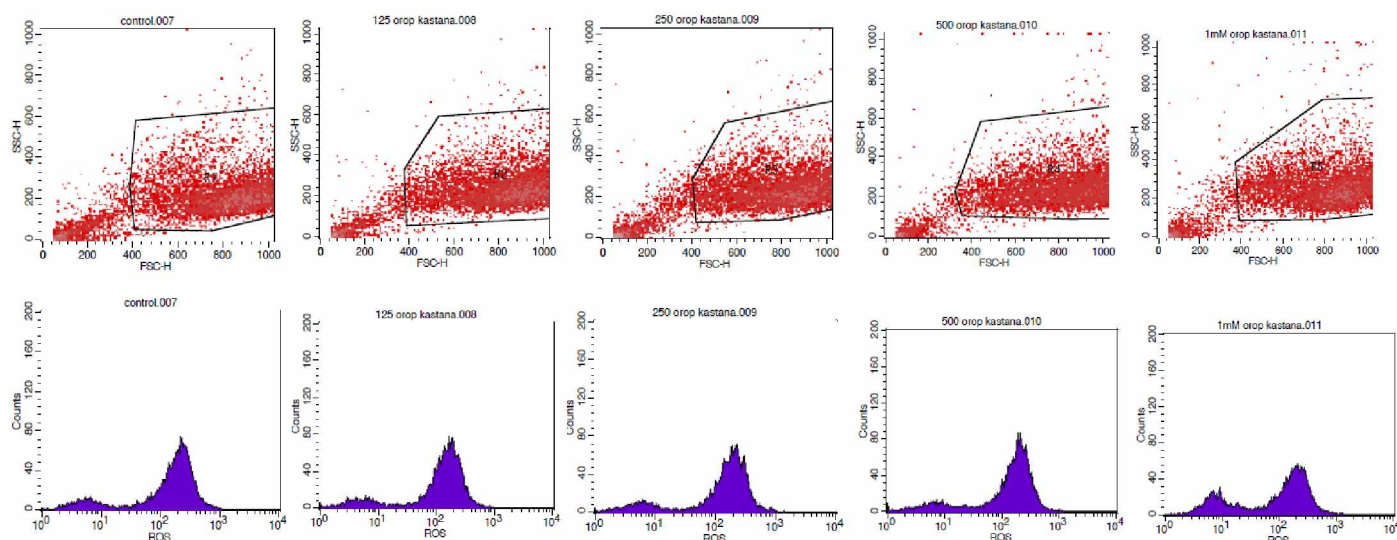
Για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 1mM. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4, μόνο στα κύτταρα που εκτέθηκαν στη μεγαλύτερη συγκέντρωση δηλαδή στο 1mM παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των ROS συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου.



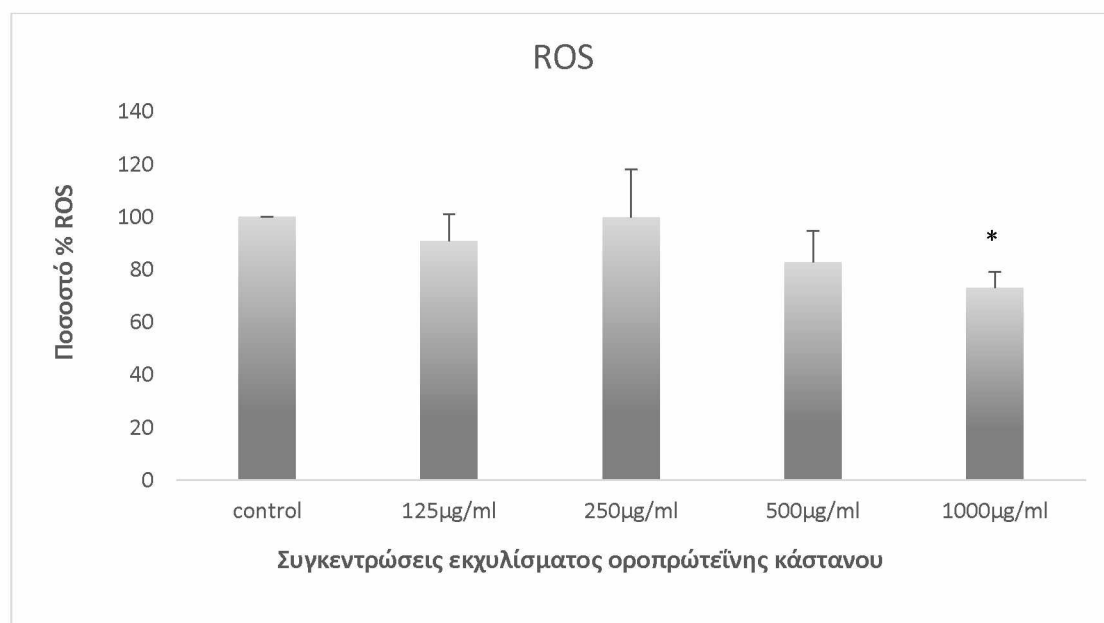
Γράφημα 1. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα των ROS σε μυοβλάστες ποντικού C2C12 μετά από επίδραση του εκχυλίσματος του καρπού κάστανου στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (31,25µg/ml, 62,5µg/ml, 125 µg/ml, 250µg/ml). Τα ιστογράμματα στο πάνω μέρος του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 nm και τα 530 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3 . Επίδραση του εκχυλίσματος κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (31,25µg/ml, 62,5µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml) στα επίπεδα των ROS των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control ενώ με + η στατιστικά σημαντική διαφορά με την συγκέντρωση 31,25µg/ml.



Γράφημα 2. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα των ROS σε μωβλάστες ποντικού C2C12 μετά από επίδραση του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος του καρπού κάστανου στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml και 1000 µg/ml). Τα ιστογράμματα στο πάνω μέρος του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 nm και τα 530 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.

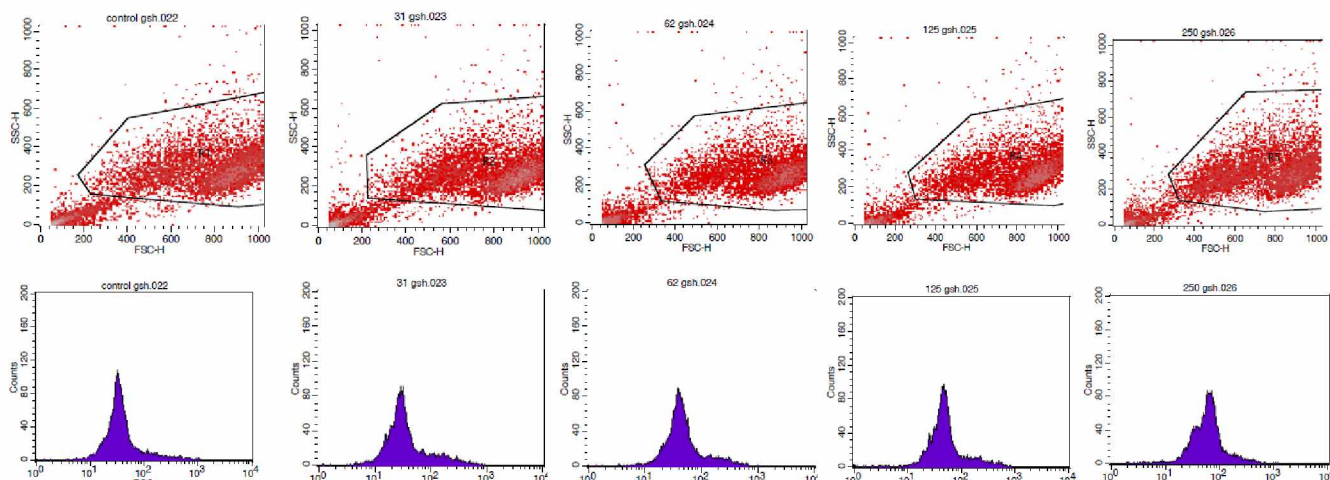


Διάγραμμα 4. Επίδραση του εκχυλίσματος της οροπρωτεΐνης κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (125 µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 1mM) στα επίπεδα των ROS των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

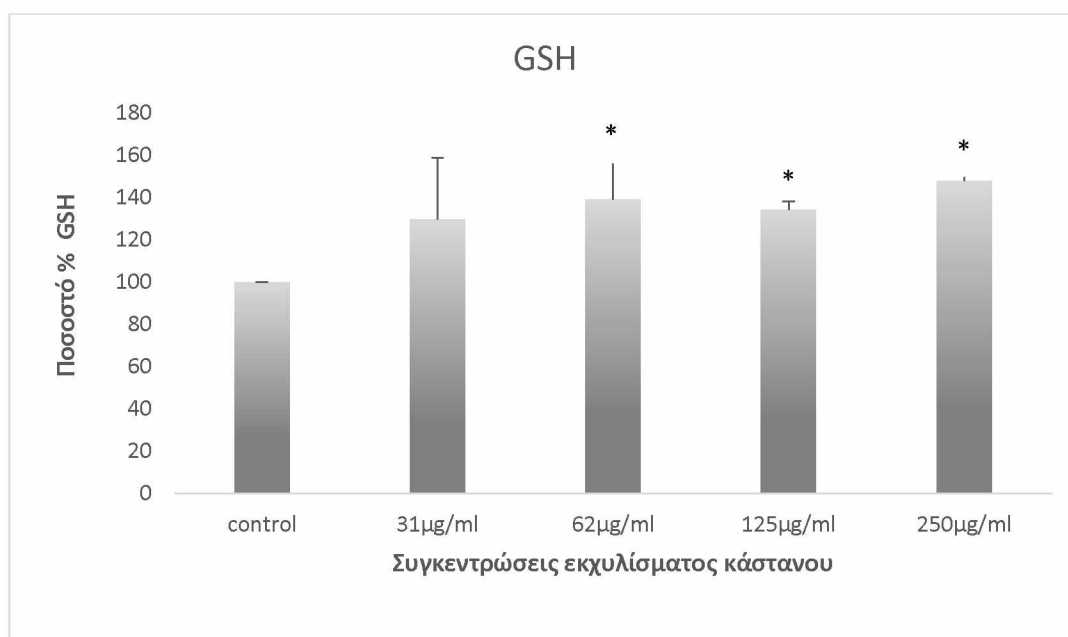
4.3 Επίδραση των εκχυλίσμάτων στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, GSH, σε μυϊκά κύτταρα C2C12.

Τα διαγράμματα 5,6 απεικονίζουν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στις αντίστοιχες 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό των ROS, αλλά και σε κύτταρα ελέγχου. Τα διαγράμματα 5,6 σχηματίστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής όπως διακρίνεται στα γραφήματα 3 και 4 αντίστοιχα.

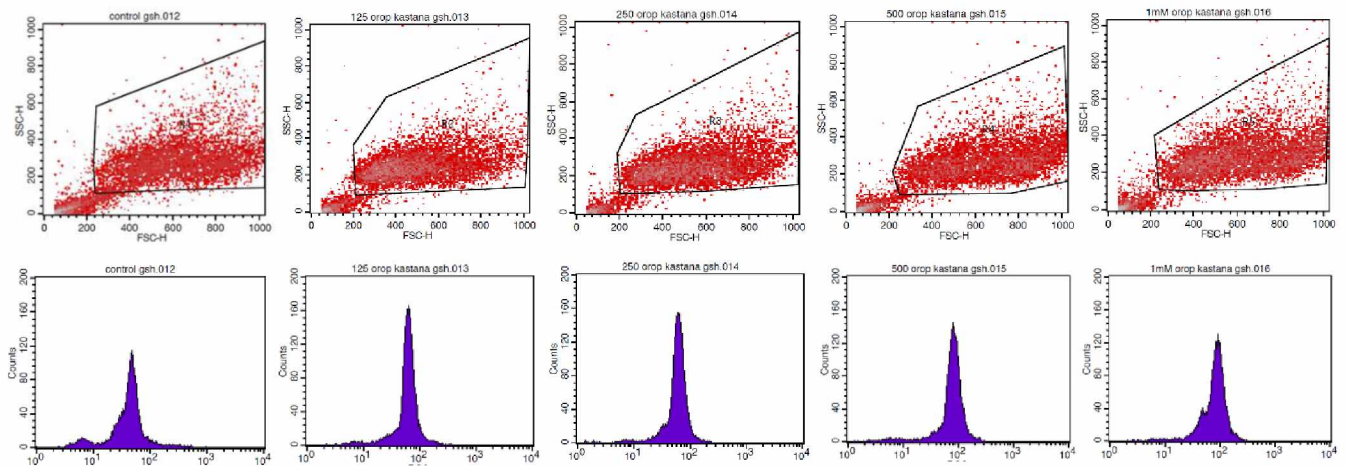
Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι παρουσία των 3 υψηλότερων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος κάστανου (62,5μg/ml, 125μg/ml και 250μg/ml) τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τα επίπεδα της GSH στα κύτταρα ελέγχου. Παράλληλα, στο διάγραμμα 6 παρατηρείται ότι παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 1000 μg/ml αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της GSH σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ σε κάθε άλλη συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με το control.



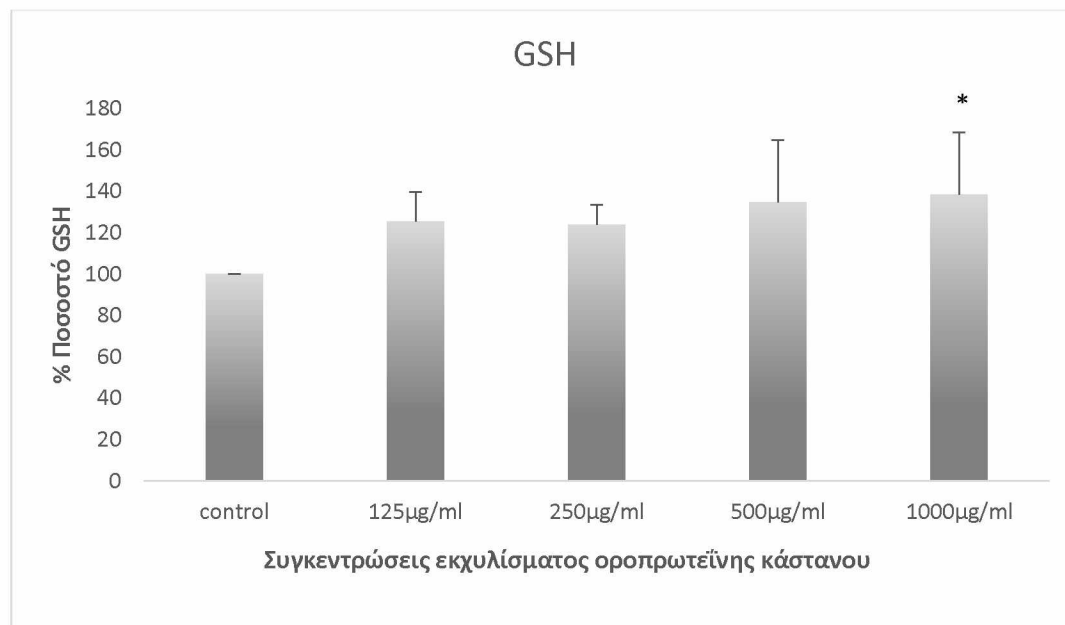
Γράφημα 3. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα της GSH σε μυοβλάστες ποντικού C2C12 μετά από επίδραση του εκχυλίσματος του καρπού κάστανου στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (31,25µg/ml, 62,5µg/ml, 125 µg/ml, 250µg/ml). Τα ιστογράμματα στο πάνω μέρος του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 nm και τα 585 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5. Επίδραση του εκχυλίσματος κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (31,25µg/ml, 62,5µg/ml 125µg/ml, 250µg/ml) στα επίπεδα της GSH των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Γράφημα 4. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα της GSH σε μυοβλάστες ποντικού C2C12 μετά από επίδραση του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος του καρπού κάστανου στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml και 1000 µg/ml). Τα ιστογράμματα στο πάνω μέρος του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 nm και τα 585 nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.

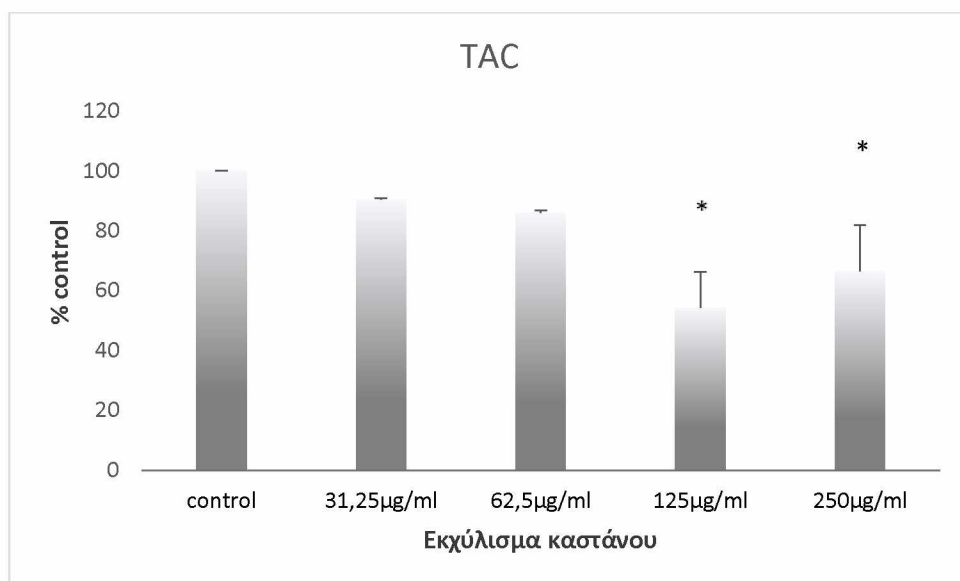


Διάγραμμα 6. Επίδραση του εκχυλίσματος της οροπρωτεΐνης κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml και 1000µg/ml) στα επίπεδα της GSH των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

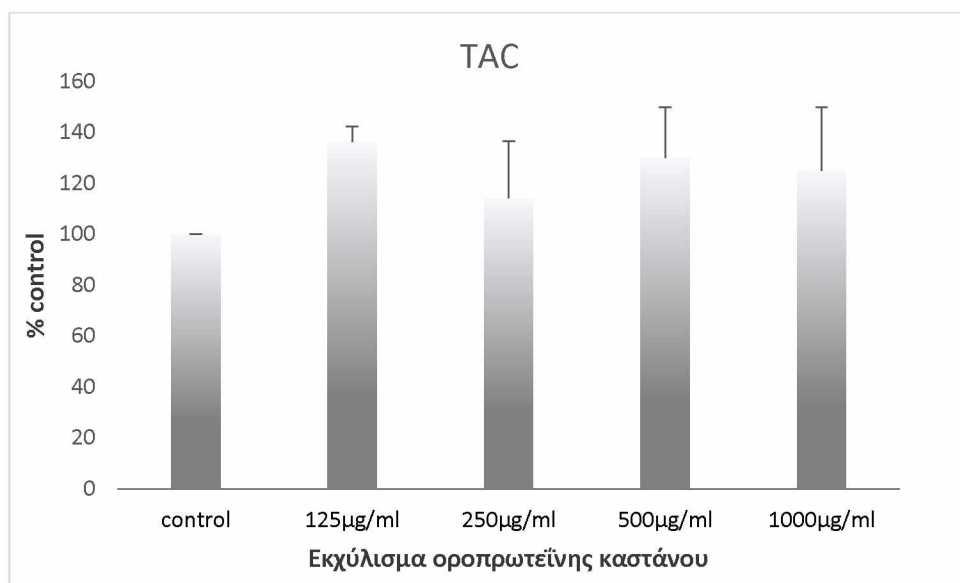
4.4 Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) μυϊκών κυττάρων C2C12

Στα διαγράμματα 7, 8 απεικονίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των μυϊκών κυττάρων παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων από τα δύο εκχυλίσματα καθώς και σε κύτταρα ελέγχου.

Από το διάγραμμα 7 διακρίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της TAC παρουσία των δύο υψηλότερων συγκεντρώσεων (500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$) του πολυφαινολικού εκχυλίσματος κάστανου. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι παρουσία του οροπρωτεΐνης κάστανου η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου.



Διάγραμμα 7. Επίδραση του εκχυλίσματος κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (32,25µg/ml, 62,5µg/ml, 125µg/ml και 250µg/ml) στα επίπεδα της TAC των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Διάγραμμα 8. Επίδραση του εκχυλίσματος οροπρωτεΐνης κάστανου σε 4 συγκεντρώσεις (125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml και 1000µg/ml) στα επίπεδα της TAC των μυϊκών κυττάρων C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

5.Συζήτηση

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλές δεκαετίες λόγω της σύνδεσης του με την πρόκληση ποικίλων ασθενειών (Barreira, 2008). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από τη διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των παραγόμενων ROS και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου. Παρόλο που φυσιολογικά ο οργανισμός διαθέτει ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενη τάση στην πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής, με σκοπό την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού έναντι των ROS (Rechner *et al.*, 2002). Τα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται εξωγενώς μπορεί να είναι φυτικά ή συνθετικά, και στόχο έχουν να καθυστερήσουν και ιδανικά να αναστείλουν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό, με σκοπό την πρόληψη πολλών ασθενειών (Halliwell *et al.*, 1992). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά συμπληρώματα φαίνεται να εμφανίζουν παρενέργειες και για αυτό το λόγο η χρήση τους περιορίζεται. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στην εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες (Rechner *et al.*, 2002).

Οι πολυφαινόλες, φυτοχημικές ενώσεις με ισχυρή δράση, συντίθενται στα φυτά, ως δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελούν μέρος του μηχανισμού άμυνας τους για την εξουδετέρωση των ROS (Wollgast and Anklam, 2000). Γενικά, οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν σημαντική βιοδραστικότητα όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, καρδιο- και νευροπροστατευτική (Fresco *et al.*, 2006). Το ενδιαφέρον για τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά αυξήθηκε σημαντικά την τελευταία δεκαετία λόγω της συμβολής τους στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες (Silva *et al.*, 2007). Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι οι διατροφικές πολυφαινόλες έχουν προστατευτική δράση ενάντια στη στεφανιαία νόσο, τον καρκίνο, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση (Reinansalo *et al.*, 2015). Επειδή οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις είναι δύσκολο να απομονωθούν, ενώ και τα πολυφαινολικά εκχυλίσματά έχουν αρκετές φορές λόγω συνέργειας καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη των καθαρών μορίων, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ως αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων (Calliste *et al.*, 2005).

Τα εκχυλίσματα από τον καρπό της καστανιάς (Ribeiro *et al.*, 2007) καθώς και από τα φύλλα της αλλά και άλλων τμημάτων του φυτού περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις πολυφαινολικών ενώσεων και για αυτό σε αρκετές μελέτες έχουν εξεταστεί οι ιδιότητές τους (Barreira *et al.*, 2010). Έτσι, έχει βρεθεί ότι το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες, του κάστανου του είδους *Castanea sativa* κυμαίνεται ανάλογα με την ποικιλία. Πρώτες σε πολυφαινόλες θεωρούνται οι ισπανικές ποικιλίες με 2,17 έως 3,51 mg GAE/g dry weight(dw) (Suárez *et al.*, 2012), ενώ ακολουθούν οι ελληνικές με 2,59 έως 3,28 mg GAE/g dw (Suárez *et al.*, 2012). Αντίστοιχα στις τουρκικές ποικιλίες οι συνολικές πολυφαινόλες κυμαίνονται μεταξύ 1,66 και 2,70 mg GAE/g (Akbulut *et al.*, 2017), ενώ στη Βοσνία-Ερζεγοβίνη από 0,35 έως 0,49 mg GAE/g. Από αντίστοιχες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι το συνολικό περιεχόμενο του καρπού κάστανου σε πολυφαινόλες εξαρτάται κυρίως από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, σε ίδιες ποικιλίες του είδους *Castanea sativa* στην Πορτογαλία παρατηρήθηκε ότι σε μεγαλύτερο υψόμετρο οι καστανιές εμφάνισαν μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών στον καρπό τους συγκριτικά με καλλιέργειες τις ίδιας ποικιλίας σε χαμηλότερο υψόμετρο (Dinis *et al.* 2011). Αντίστοιχα, η συγκέντρωση του εδάφους σε φώσφορο, μαγνήσιο, κάλιο και ασβέστιο επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του καρπού. Έτσι, σε έδαφος με μεγαλύτερη συγκέντρωση φωσφόρου αποδείχθηκε ότι το συνολικό περιεχόμενο του καρπού ήταν μεγαλύτερο συγκριτικά με έδαφος φτωχότερο σε αυτά τα ανόργανα στοιχεία (Dinis *et al.* 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι από αναλύσεις που έγιναν στις πορτογαλικές ποικιλίες αποδείχθηκε ότι κυρίαρχες πολυφαινόλες είναι το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από αναλύσεις και άλλων ποικιλιών του είδους *Castanea sativa* (Dinis *et al.*, 2011).

Βάσει των παραπάνω, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικού εκχυλίσματος από τον καρπό του είδους *Castanea sativa* από την περιοχή της Μελιβοίας του Ν. Λάρισας, αλλά και του αντίστοιχου ενθυλακωμένου προϊόντος με μέσω ενθυλάκωσης την οροπρωτεΐνη γάλακτος. Η ενθυλάκωση των πολυφαινολών αποτελεί συνήθη μέθοδο προστασίας τους από την οξείδωση. Επιπλέον, βάσει μελετών φαίνεται ότι η διαδικασία αυτή συμβάλλει στην αύξηση της βιοδραστικότητας καθώς και της βιοδιαθεσιμότητας του ενθυλακωμένου προϊόντος (Young *et al.*, 1993). Επομένως, στόχος της ενθυλάκωσης είναι η βελτίωση των ιδιοτήτων του εκχυλίσματος. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ώστε να προσδιοριστεί η

αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (GSH) και των ROS σε μυϊκά κύτταρα C2C12.

Όσον αφορά τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στα μυϊκά κύτταρα C2C12, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS παρουσία του εκχυλίσματος κάστανου στις συγκεντρώσεις 125 μg/ml και 250 μg/ml σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου αλλά και με τα κύτταρα που επώαστηκαν με εκχύλισμα συγκέντρωσης 31,25 μg/ml. Αντίστοιχα, στο εκχύλισμα της οροπρωτεΐνης κάστανου η υψηλότερη συγκέντρωση (1mM) εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Από σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας (Στάγκος-Γεωργιάδης 2020) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, το εκχύλισμα καστανού και το αντίστοιχο ενθυλακωμένο εκχύλισμα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των ROS στις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, από μελέτη των Grodnic *et al.*, (2011) παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα των ROS μετά από επώαση β-παγκρεατικών κυττάρων σε εκχύλισμα κάστανου (0,02 mg/ml) τα οποία είχαν αρχικά εκτεθεί στον οξειδωτικό παράγοντα στρεπτοζοτοκίνη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των Chiarini *et al.*, (2013). Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη έγινε επώαση κυττάρων του μυοκαρδίου με εκχύλισμα κελύφους κάστανου από το είδος *Castanea sativa* για 24 ώρες. Στη συνέχεια προκλήθηκε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα με τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου για μισή ώρα. Από τις μετρήσεις παρατηρήθηκε μείωση των ROS παρουσία του εκχυλίσματος ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις της τάξης του 1 μg/ml σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια *in vivo* μελέτη που έγινε σε ποντίκια δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των ROS μετά από χορήγηση στην τροφή τους για 35 ημέρες εκχυλίσματος κάστανου 192.6 mg και 385,2 mg ανά εβδομάδα και ανά ποντίκι ποσότητα που αντιστοιχούσε στο 0,55% w/w και το 1,1% w/w αντίστοιχα της συνολικής διατροφής του (Rodrigues *et al.*, 2020). Επομένως, από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι η παρούσα εργασία είναι η πρώτη, από όσο γνωρίζουμε, που δείχνει ότι εκχύλισμα καστανών βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αντίθετα, και στις δύο εργασίες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι εκχυλίσματα καστανών μειώνουν τα ROS μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει ότι πιθανότατα μία μελλοντική εργασία αντίστοιχη με την παρούσα που θα περιλαμβάνει την παρουσία οξειδωτικού παράγοντα θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο εμφανή αποτελέσματα όσον αφορά την ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, ήταν σημαντικό ότι και το ενθυλακωμένο εκχύλισμα καστώνων μείωσε στατιστικά σημαντικά τα ROS στα μυϊκά κύτταρα σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g/ml}$ σε ποσοστό 26,9% ενώ το εκχύλισμα καστώνων στα 125 και 250 $\mu\text{g/ml}$ σε 14,9% και 16,7% αντίστοιχα. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το ενθυλακωμένο εκχύλισμα περιέχει μόνο 10% πολυφαινόλες, επομένως στα 1000 $\mu\text{g/ml}$ ενθυλακωμένου εκχυλίσματος μόνο τα 100 $\mu\text{g/ml}$ είναι πολυφαινόλες. Άρα, με βάση τις πολυφαινόλες, το ενθυλακωμένο εκχύλισμα και το απλό εκχύλισμα καστώνων έχουν παραπλήσια δράση.

Ο δεύτερος δείκτης που προσδιορίστηκε στην παρούσα εργασία ήταν η γλουταθειόνη. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH στις συγκεντρώσεις 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ παρουσία του πολυφαινολικού εκχυλίσματος κάστανου και στα 1000 $\mu\text{g/ml}$ παρουσία του πολυφαινολικού εκχυλίσματος οροπρωτεΐνης κάστανου σε μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Σε αντίστοιχη μελέτη του εργαστηρίου μας δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της ενδογενούς γλουταθειόνης στα κύτταρα EA.hy926 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος κάστανου (Στάγκος-Γεωργιάδης, 2020). Ο ίδιος δείκτης ωστόσο αυξήθηκε σε β -κύτταρα του παγκρέατος παρουσία εκχυλίσματος φλοιού του καρπού της καστανιάς (0,02 mg/ml). Πιο συγκεκριμένα, αφότου προκλήθηκε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα με οξειδωτικό παράγοντα στρεπτοζοτοκίνη για 6 ώρες τα κύτταρα επωάστηκαν με το αντιοξειδωτικό εκχύλισμα για άλλες 6 ώρες και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων GSH κατά 5 φορές σε σύγκριση με το κύτταρα ελέγχου (Grdovic *et al.*, 2011). Αύξηση στη GSH παρατήρησαν και ο Nieves (2018) σε παγκρεατικά β -κυττάρα αρουραίου τα οποία βρίσκονταν υπό την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (στρεπτοζοτοκίνη) και επωάστηκαν με το πολυφαινολικό εκχύλισμα από καρπό καστανιάς του είδους *Castanea sativa*. Ειδικότερα προσδιορίστηκε τόσο αύξηση στη συγκέντρωση της GSH όσο και μείωση στην οξείδωση της (Nieves 2018). Επομένως, φαίνεται ότι η επίδραση εκχυλισμάτων καστώνων στα επίπεδα της GSH παρουσιάζει μία ιστοεξειδικεύση η οποία αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω για να διαπιστωθεί που οφείλεται. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αύξηση της GSH στα μυϊκά κύτταρα δείχνει

ότι είναι πιθανώς ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το εκχύλισμα κάστανων μειώσε τα επίπεδα των ROS σε αυτά τα κύτταρα.

Όσον αφορά τον τρίτο δείκτη της παρούσας εργασίας παρατηρείται ότι η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου παρουσία του εκχυλίσματος του κάστανου μειώνεται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 125μg/ml και 250μg/ml. Ενώ υπό την επίδραση της οροπρωτεΐνης κάστανου φαίνεται ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, από την έρευνα του Στάγκου-Γεωργιάδη (2020) προκύπτει ότι μετά από επίδραση εκχυλίσματος καρπού κάστανου 250μg/ml σε κύτταρα EA.hy 926 αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκτιθέμενων κυττάρων συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός το οποίο αναφέρθηκε και παραπάνω ότι το ενθυλακωμένο εκχύλισμα περιλαμβάνει μόλις το 10% των πολυφαινολών του εκχυλίσματος κάστανου, επομένως τα 1000 μg/ml περιέχουν 100 μg/ml πολυφαινολικού εκχυλίσματος.

Από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι το πολυφαινολικό εκχύλισμα του καρπού κάστανου καθώς και το ενθυλακωμένο εκχύλισμα προκαλεί αύξηση της GSH ενώ οδηγεί αντίστοιχα σε μείωση των ROS. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου φαίνεται να μειώνεται παρουσία του εκχυλίσματος κάστανου ενώ φαίνεται να μη μεταβάλλεται παρουσία της οροπρωτεΐνης κάστανου. Μία πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος είναι άμεση με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή των ενδογενών αντιοξειδωτικών του κυττάρου ώστε να εξισορροπείται το συνολικό περιεχόμενο του σε αντιοξειδωτικά. Σε αυτή την περίπτωση η άμεση δράση του εκχυλίσματος μειώνει τα επίπεδα των ROS ενώ παράλληλα δεν καταναλώνεται με τον ίδιο ρυθμό η GSH και για αυτό παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της. Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι παρουσία του εκχυλίσματος ενισχύεται η σύνθεση της γλουταθειόνης ενώ παράλληλα εξουδετερώνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου και για αυτό παρατηρείται μείωση των ROS. Σε αυτή την περίπτωση η μείωση της TAC του κυττάρου μπορεί να οφείλεται σε μείωση άλλων ενδογενών αντιοξειδωτικών ως αποτέλεσμα προσαρμοστικού μηχανισμού λόγω της αύξησης της GSH. Η αύξηση στη σύνθεση της GSH θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα αύξησης της σύνθεσης και της

δράσης της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης παρουσία του εκχυλίσματος. Σχετικά με τη σύνθεση της GSH θα μπορούσε να ενεργοποιείται το μονοπάτι σύνθεσης της γλουταθειόνης ή και να αυξάνεται το ένζυμο λιγάση της γλουταμικής κυστεΐνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της GSH.

Αξίζει να σημειωθεί ότι βάσει των περισσότερων μελετών ο καρπός του κάστανου διαθέτει μικρότερο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο συγκριτικά με τον εξωτερικό και εσωτερικό φλοιό του, το κέλυφος του κάστανου καθώς και τα φύλλα του. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας αυτά τα υπολείμματα τα οποία παραμένουν αναξιοποίητα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων και καλλυντικών (Barreira *et al.*, 2008).

Συμπερασματικά, το πολυφαινολικό εκχύλισμα που απομονώνεται από τον καρπό της καστανιάς του είδους *Castanea sativa* φαίνεται να έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται τόσο από την παρούσα εργασία όσο και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ιδιαίτερα, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι παρουσία του εκχυλίσματος καστανών σε μυϊκά κύτταρα ποντικών C2C12 μειώθηκαν τα επίπεδα των ROS, αυξήθηκε η ενδογενής γλουταθειόνη ενώ η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου παρουσία του εκχυλίσματος κάστανου εμφάνισε μείωση και παρουσία του εκχυλίσματος οροπρωτεΐνης κάστανου δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Τα αποτελέσματα ήταν πιο εμφανή παρουσία του καθαρού εκχυλίσματος συγκριτικά με το ενθυλακωμένο παρόλο που στο δεύτερο οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις ήταν μεγαλύτερες συγκριτικά με το καθαρό εκχύλισμα. Ωστόσο, αν λάβουμε υπόψη την περιεκτικότητα του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος σε πολυφαινόλες τότε εμφανίζει παραπλήσια δράση με το απλό εκχύλισμα καστανών. Από αυτά τα δεδομένα φαίνεται ότι τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα καστανιάς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εύκολα προσβάσιμα, φυσικά αντιοξειδωτικά στη διατροφή και στη θεραπεία παθοφυσιολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Zincovic *et al.*, 2012) αλλά σε κάθε περίπτωση απαιτείται να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα αλλά και να μετρηθούν περισσότεροι δείκτες του οξειδωτικού στρες ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρα το εκχύλισμα.

6.Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

Ντουνούση ΕΧ, Τσελέπης Α, Σιαμόπουλος ΚΧ, (2009). Οξειδωτικό στρες, μηχανισμός δράσης και ο ρόλος του στη χρόνια νεφρική νόσο. *Ελληνική Νεφρολογία*. 21,34-45.

Παπαγεωργίου ΓΕ, (2005). Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση. *University studio press*: Θεσσαλονίκη.

Στάγκος Γεωργιάδης, (2020). Μεταπτυχιακή Διατριβή: Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος καστανών από Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castaneasativa*) σε ενδοθηλιακά κύτταρα. *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας*: Λάρισα.

Ξένη βιβλιογραφία

Ábrigo J, Elorza AA, Riedel CA, Vilos C, Simon F, Cabrera D, Estrada L, Verrugio CC, (2018) Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-17.

Akbulut M, Bozhuyuk M, Ercisli S, Skender A, Sorkeh K, (2017). Chemical Composition of Seed Propagated Chestnut Genotypes from Northeastern Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(2), 425-430.

Avanzato D, (2009) Following Chestnut Footprints (*Castanea* spp.) - Cultivation and Culture, Folklore and History, Tradition and Uses, vol. 9 of *Scripta Horticulturae* (International Society for Horticultural Science).

Barreira, J, Ferreira I, Oliveira M. and Pereira J, (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, 107(3), 1106-1113.

Barreira, J., Ferreira, I., Oliveira, M. and Pereira, J., 2010. Antioxidant Potential of Chestnut (*Castanea sativa* L.) and Almond (*Prunus dulcis* L.) By-products. *Food Science and Technology International*, 16(3), 209-216.

Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI, (2006) Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1,1-17

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, (2012) Biochemistry, 7th edition. New York: W H Freeman.

Bhandary B, Marahatta A, Kim H, Chae H, (2012) An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 434-456.

Bradford MM, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Duroux JL (2005). Castanea sativa Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: an electronic spin resonance study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 282288

Cheeseman KH, Slater TF, (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.

Clifford MN, (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362-372.

Conedera M, Manetti M, Giudici F, Amorini E, (2016) Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia mediterranea*, 30, 179-193.

Crowe KM, Francis C, (2013) Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113, 1096-103.

Dinis LT, Oliveira MM, Almeida J, Costa R, Gomes-Laranjo J, Peixoto F, (2012) Antioxidant activities of chestnut nut of *Castanea sativa* Mill. (cultivar 'Judia') as function of origin ecosystem. *Food Chemistry*, 132, 1-8.

Droge W, (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.

Durazzo A, Lucarini M, Camilli E, Marconi S, Gabrielli P, Lisciani S, Gambelli L, Aguzzi A, Novellino E, Santini A, Turrini A, Marletta L, (2018). Dietary Lignans: Definition, Description and Research Trends in Databases Development. *Molecules*, 23, 3251.

Eisner T, Aneshansley DJ, (1999). Spray aiming in the bombardier beetle: Photographic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9705-9.

Fresco P, Borges F, Diniz C and Marques M, (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6), 747-766.

Fridovich I, (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201, 1203-1209.

Genestra M, (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cellular Signaling*, 19, 1807-1819.

Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, Tsioutsouliti A, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, 33(11), 1099-112.

Gutteridge JM, (1993). Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radical Research*, 19, 141-158.

- Habas K, Brinkworth MH, Anderson D, (2017) Diethylstilbestrol induces oxidative DNA damage, resulting in apoptosis of spermatogonial stem cells *in vitro*. *Toxicology*, 382,117–21
- Halliwell B, Gutteridge J, (1985) Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1, 331-332.
- Halliwell B, (1995). How to characterize an antioxidant- An update. *Biochemistry Society Symposia*,61:73–101
- Halliwell B, Gutteridge JM and Cross CE, (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598–620.
- Halliwell B, (2003) Free Radicals and other reactive species in disease. *Nature Encyclopedia of life sciences*, 2001,1-7.
- Janaszewska A, Bartosz G (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of clinical laboratory investigation*, 62(3),231-6.
- Knight JA, (1995). Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*, 25, 111–121.
- Kohen R, Nyska A, (2002) Invited review Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620–650.
- Košňovská J, (2013) The Origin, Archaeobotany and Ethnobotany of Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Miller) in the Czech Republic. IANSA.
- Kramer PA, Duan J, Qian WJ, Marcinek DJ, (2015) “The measurement of reversible redox dependent post-translational modifications and their regulation of mitochondrial and skeletal muscle function,” *Frontiers in Physiology*, 6, 347.
- Krinsky NI, (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,200,248–54.
- Kumar N, Goel N, (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, p.e00370.
- Lecour S, Lamont KT, (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11,1191–9.
- Li Y, Schellhorn HE, (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. Critical Review. *Journal of Nutrition*, 137,2171–2184.

- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N, (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118.
- Magrone T, Jirillo E, (2012). Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71, 316–21.
- Nguyen LA, He H, Pham-Huy C, (2006) Chiral drugs. An overview. *International Journal of Biomedical Science (IJBS)*, 2, 85–100.
- Neves J, (2018). *Castanea sativa* Mill. Extract Cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Plants*, 24(3), 1-4.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR, (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- Pascual-Ahuir A, Manzanares-Estreder S, Proft M, (2017). Pro- and Antioxidant Functions of the Peroxisome-Mitochondria Connection and Its Impact on Aging and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-17.
- Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB, (2009) Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalber A, (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S112–20.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30, 11–26.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-13.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard G., Moore KP, Rice-Evans CA (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 220–235.
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen RO, (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1-24.
- Ribeiro B, Rangel J, Valentão P, Andrade PB, Pereira JA, Bolke H, Seabra RM (2007). Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chemistry* 100, 504-508.
- Rodrigues P, Ferreira T, Nascimento-Gonçalves E, Seixas F, Gil da Costa RM, Martins T, Neuparth MJ, Pires MJ, Lanzarin G, Félix L, Venâncio C, Ferreira ICFR, Bastos MMSM, Medeiros R, Gaivão I, Rosa E, Oliveira PA, (2020). Dietary Supplementation

with Chestnut (*Castanea sativa*) Reduces Abdominal Adiposity in FVB/n Mice: A Preliminary Study. *Biomedicines*, 8, 75.

Royston D, (1988). Free radicals. *Anaesthesia*, 43, 315-320.

Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y, (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region, *Food Chemistry*. 101,1012–1018.

Singh A, Holvoet S, Mercenier A, (2011) Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 1346–59.

Suárez M, Galdón B, Mesa D, Romero C, Rodríguez E, (2012). Sugars, Organic Acids and Total Phenols in Varieties of Chestnut Fruits from Tenerife (Spain). *Food and Nutrition Sciences*, 03(06), 705-715.

Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R, (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.

Williamson G, Holst B, (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition* 99:S55–8.

Wollgast J and Anklam E, (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.

Young SL, Sarda X, Rosenberg M (1993). Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science* 76, 2868–2877.

Young I, Woodside J, (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–186.

Zivkovic J, Zekovi Z, Muji I, Tumbas V, Cvetkovi D, Spasojevi I (2009). Antioxidant Properties of Phenolics in *Castanea sativa* Mill. Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 47 (4) 421–427.